

Aus dem Fachbereich  
für Innere Medizin I  
Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

**CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatorische T-Zellen und ihr Einfluss auf dendritische  
Zellen in Hinblick auf die Pathophysiologie chronisch entzündlicher  
Darmerkrankungen**



Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin (Dr. med.)

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Anna Pallauf  
aus Gießen

Regensburg 2010



Aus dem Fachbereich  
für Innere Medizin I  
Prof. Dr. med. Jürgen Schölmerich  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

**CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatorische T-Zellen und ihr Einfluss auf dendritische  
Zellen in Hinblick auf die Pathophysiologie chronisch entzündlicher  
Darmerkrankungen**



Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin (Dr. med.)

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Anna Pallauf  
aus Gießen

Regensburg 2010

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler
2. Berichterstatter:	PD Dr. med. Frauke Bataille
Tag der mündlichen Prüfung:	24.06.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Derzeitiger Wissensstand zur Pathogenese von Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen</i>	1
1.1.1	Genetische Faktoren - CARD15/NOD2 .....	2
1.1.2	Erworbene Faktoren .....	2
1.2	<i>Immunologie: CED – eine Inflammatorische Überreaktion des Körpers?.....</i>	3
1.3	<i>Regulatorische T-Zellen.....</i>	5
1.3.1	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Zellen .....	7
1.3.2	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4.....	8
1.3.3	Foxp3.....	8
1.3.4	$\alpha\text{E}\beta\text{7}$ -Integrin .....	9
1.4	<i>Zytokine, die für die Funktion der regulatorischen T-Zellen eine wichtige Rolle spielen .....</i>	11
1.4.1	Interleukin-10 .....	11
1.4.2	TGF- $\beta$ .....	12
1.5	<i>Dendritische Zellen.....</i>	13
1.6	<i>Arbeitshypothese und Zielsetzung.....</i>	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1	<i>Materialien.....</i>	16
2.1.1	Labormaterialien und Geräte .....	16
2.1.2	Chemikalien .....	17
2.1.3	Antikörper .....	18
2.1.4	Häufig verwendete Puffer und Medien: .....	20
2.1.5	Verwendete Software: .....	21
2.2	<i>Methoden.....</i>	22
2.2.1	Generierung dendritischer Zellen (DCs) aus dem Knochenmark .....	22
2.2.2	Isolierung von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -T-Zellen aus der Milz .....	22
2.2.3	Isolierung der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -Zellen aus mesenterialen Lymphknoten..	24
2.2.4	Isolierung der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -Zellen aus der Lamina propria mucosae..	24
2.2.5	In vitro-Stimulation mit anti-CD3 und IL-2 zur Beurteilung der Zytokinsekretion.....	26
2.2.6	Kokultur .....	26
2.2.7	Auswertung mithilfe des Durchflusszytometers .....	29

2.2.8	Vorbereitung der Zellen für die FACS-Messung.....	30
2.2.9	RNA.....	32
2.2.10	CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> -Transfermodell in SCID-Mäusen.....	35
2.2.11	Luminex.....	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
3.1	<i>Isolierung der untersuchten Zellen.....</i>	<i>40</i>
3.1.1	Isolierung von Milzzellen gesunder und kranker Tiere .....	40
3.1.2	Isolierung von mesenterialen Lymphknotenzellen gesunder und kranker Tiere .....	41
3.1.3	Isolierung von Zellen aus der Lamina propria des Colons gesunder und kranker Tiere .	42
3.2	<i>Charakterisierung der isolierten Zellen.....</i>	<i>44</i>
3.2.1	CD25 als ein Marker für regulatorische T-Zellen.....	44
3.2.2	Untersuchung des Vorkommens von $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf T-Lymphozyten .....	49
3.2.3	Foxp3 .....	53
3.2.4	Zytokinsekretion der charakterisierten regulatorischen T-Zellen.....	59
3.3	<i>Ergebnisse der Kokultur der T-Zell-Subpopulationen mit DCs .....</i>	<i>63</i>
3.3.1	Kokultur mit isolierten T-Zellen der Milz & DCs .....	64
3.3.2	Kokulturen mit isolierten Lamina propria-T-Lymphozyten & DCs.....	68
3.3.3	IL-12 in der Kokultur.....	72
3.3.4	Effekte von Anti-Interleukin-10-Antikörpern in der Kokultur .....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>96</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>113</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>114</b>
<b>12</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>116</b>

# 1 Einleitung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), denen die beiden Krankheitsbilder Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) zugeordnet werden, treten in Deutschland mit einer Inzidenz von 5/100.000 pro Jahr für den MC und 6/100.000 pro Jahr für die CU auf <sup>1, 2</sup>. Europaweit wird die Inzidenz für den MC auf etwa 1 - 10/100.000 pro Jahr und für die CU auf 5 - 15/100.000 geschätzt. Das Krankheitsbild des MC, das nach seiner häufigen Lokalisation im terminalen Ileum auch „Ileitis regionalis“ genannt wird, ist eine diskontinuierliche, segmental auftretende Entzündung aller Darmwandschichten, die den gesamten Intestinaltrakt befallen kann. Die Colitis ulcerosa ist eine klassischerweise nur auf das Colon und Rektum begrenzte Entzündung, die ausschließlich die Mukosa und Submukosa der Darmwand betrifft und sich kontinuierlich vom Rektum ausgehend ausbreitet.

Die Pathogenese von CED ist trotz intensiver Forschung letztlich noch immer unklar, wobei in den letzten Jahren bereits wesentliche pathomechanistisch bedeutsame immunologische Interaktion aufgedeckt werden konnten.

## 1.1 Derzeitiger Wissensstand zur Pathogenese von Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen

Die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist nach wie vor ungeklärt, so dass eine kausale Therapie bislang nicht möglich ist und für die meist jungen Patienten, die langjähriger medikamentöser Behandlung bedürfen, nur symptomatische Therapieansätze zur Verfügung stehen. Es konnten jedoch in den letzten Jahren wesentliche Erkenntnisse um die pathogenetischen insbesondere immunologischen Zusammenhänge der intestinalen Entzündungsprozesse gewonnen werden. Dabei wurde die Bedeutung antigen-präsentierender Zellen bei der Initiierung und Perpetuierung der Colitis offensichtlich. Ihre genaue Funktion und die morphologischen und funktionellen Veränderungen der sie bei einer Entzündung unterliegen sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Ebenso ist erst in den letzten Jahren begonnen worden Informationen über die Interaktion dieser Zellen mit anderen in der Mukosa lokalisierten Immunzellen – wie T-Lymphozyten – zu erlangen.

### 1.1.1 Genetische Faktoren - CARD15/NOD2

1996 wurde zum ersten Mal eine Gen-Region auf dem Chromosom 16 als Suszeptibilitäts-Lokus beschrieben, die vermehrt bei Patienten mit Morbus Crohn jedoch nicht bei Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen werden konnte<sup>3, 4</sup>. Im Jahre 2001 wurde das sogenannte NOD2-/CARD15-Gen in der perizentrischen Region des Chromosoms 16 identifiziert<sup>5</sup>. Es wird vermutet, dass das Genprodukt von CARD15/NOD2 einen intrazellulären Rezeptor für bakterielle Wandbestandteile darstellen könnte<sup>6</sup>. Drei Hauptmutationen in diesem Gen konnten dabei mit Morbus Crohn (MC) assoziiert werden<sup>7</sup>. Bei Mutation eines Allels ist das relative Risiko an einem Morbus Crohn zu erkranken im Vergleich zur Normalbevölkerung ungefähr dreifach erhöht. Im Falle einer Veränderung beider CARD15-Allele steigt das Erkrankungsrisiko sogar um das 30 bis 40fache. Insgesamt können Mutationen dieser Genregion bei etwa 20-30% der an MC erkrankten Patienten nachgewiesen werden<sup>8</sup>, die zudem wie in klinischen Studien gezeigt werden konnte, mit einer rascheren Progression der Erkrankung und mit einem penetrierenden und stenosierenden Verlauf assoziiert zu sein scheinen<sup>9-11</sup>. Insgesamt können jedoch nur etwa 20% der genetischen Prädisposition für einen Morbus Crohn durch CARD15-Mutationen erklärt werden, weswegen Veränderungen in weiteren Suszeptibilitätsgenen für die genetische Prädisposition verantwortlich sein müssen. In den darauf folgenden Jahren konnten so weitere Genregionen auf den Chromosom 12 (IBD2), 6 (IBD3) und 14 (IBD4) identifiziert werden, die ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung eines Morbus Crohn spielen könnten.

Für das Krankheitsbild der Colitis ulcerosa konnten vergleichbare eindeutige genetische Zusammenhänge bislang nicht identifiziert werden.

Insgesamt ist jedoch sicher, dass die bisher beschriebenen Mutationen des CARD15/NOD2-Gens nicht allein für das Auftreten der Erkrankung verantwortlich gemacht werden können, da nicht immer das Vorhandensein einer NOD2-Mutationen zu der Ausbildung der Erkrankung führt.

### 1.1.2 Erworbene Faktoren

Neben der genetischen Genese werden viele weitere Faktoren diskutiert, wie beispielsweise bakterielle, virale oder Umweltfaktoren, die durch eine abnorme Aktivierung des körpereigenen Immunsystems die Erkrankung auslösen könnten.



So scheinen Infektionen mit helminthischen Parasiten vor CED zu schützen<sup>12</sup>. Dabei wird als pathomechanistisch bedeutsam vermutet, dass diese Parasiten durch die Induktion einer primären  $T_H2$ -Helferzell-Antwort in Konkurrenz mit der überschießenden Immunantwort bei CED stehen.

Was Umweltfaktoren anbelangt, konnte gezeigt werden, dass eine Colitis ulcerosa sich häufiger bei Nichtrauchern entwickelt, während ein Morbus Crohn häufiger bei Rauchern zur Ausprägung kommt<sup>13</sup>. Der genaue Mechanismus ist unklar, allerdings wird vermutet, dass Nikotin eine immunsuppressive Wirkung auf  $CD4^+$ - $T_H2$ -Helferzellen ausübt, die sich bei der Pathogenese einer Colitis ulcerosa günstig auswirken könnte, während die Funktion der  $T_H1$ -Zellen die ggf. bei der Pathogenese des Morbus Crohn von Bedeutung sind, von diesem Effekt wenig berührt werden<sup>14</sup>.

Eine ebenso nicht zu vernachlässigende Rolle scheinen psychosoziale Faktoren zu spielen. Bei einer Befragung von Colitis ulcerosa-Patienten gaben 40% der Befragten an, dass sich bei ihnen durch psychischen Stress Krankheitsschübe der Colitis auslösen oder verstärken lassen<sup>15</sup>.

## **1.2 Immunologie: CED – eine Inflammatorische Überreaktion des Körpers?**

Das spezialisierte Immunsystem des Darms muss mit einer Vielzahl an Antigenen – sei es aus Nahrung, körpereigener endogener Flora und pathogenen Organismen zurechtkommen. Auf der einen Seite müssen dabei pathogene Antigene erkannt und eliminiert werden, um Erkrankungen zu verhindern, auf der anderen Seite muss Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen und kommensalen Bakterien aufgebaut werden, um hier eine inadäquate immunologische Reaktion zu verhindern.

Viele Arbeiten haben sich damit beschäftigt, ob CED durch eine überschießende immunologische Antwort auf die kommensale Flora des Darmes begründet sein könnte<sup>16 17</sup>. Dabei gehen die Forschergruppen nicht davon aus, dass es sich nur um eine einzelne Bakterien-Spezies handelt, die diese Überreaktion induzieren könnte. Für *Bacteroides*-Spezies<sup>17</sup> und *Helicobacter hepaticus*<sup>18</sup> konnte nachgewiesen werden, dass sie bei immundefizienten Mäusen zu einer chronischen Colitis führen oder diese verstärken.

Strauch et al. führten ebenfalls Experimente durch, um den Einfluss der bakteriellen Flora in Bezug auf CED näher zu beleuchten. Dabei zeigte sich wie oben erwähnt, in murinen Transfermodellen einer intestinalen Entzündung, dass sich nach Transfer Colitis-induzierender T-Zellen, die aus keimfrei gehaltenen Tieren isoliert wurden, eine schwerere Colitis ausbildet als wenn die Tiere T-Zellen normaler Balb/c-Mäuse erhalten. Des Weiteren zeigte sich, dass die Mäuse, die eine milde und spätere Colitis aufwiesen, mesenteriale Lymphknoten-Zellen besaßen, die nach 6 bis 8 Wochen mehr Interleukin-10 (s. u.) produzierten <sup>19</sup>. Dies ließ vermuten, dass offensichtlich durch Interaktion des Immunsystems mit der normalen Keimflora Toleranz gegenüber derselben durch Generierung regulatorischer T-Zell-Mechanismen aufgebaut wird.

Weiterführend konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass adenovirale Oligodeoxynucleotide (AV-ODN), die Effekte bakterieller DNA blockieren, im Tiermodell zu einer Verbesserung einer bestehenden Colitis führen konnten <sup>20</sup>. Diese Beobachtung stützt die These, dass bakterielle DNA, die aus dem Darmlumen stammt, bei erhöhter Durchlässigkeit der Darmwand, möglicherweise eine chronische Entzündung unterhalten kann.

Insgesamt legen bisherige Ergebnisse nahe, dass diverse Bakterienstämme bei Ungleichgewicht der endogenen Darmflora oder Defekt in der physiologischen Barriere des Darmlumens in der Lage sind, eine chronische Entzündung des Colons zu induzieren bzw. zu unterhalten <sup>21</sup>. Bei Tieren mit intakter Darmflora konnte dies nicht beobachtet werden.

Neben pathogenen Keimen sind über die Jahre auch apathogene Bakterien sogenannte Probiotika bekannt geworden. So werden dem Bakterium *Escherichia coli* Nissle Stamm 1917 sowohl im Maus-Modell für chronische Colitis <sup>22</sup> als auch für die Remissionserhaltung im Rahmen einer Colitis ulcerosa präventive Effekte zugeschrieben <sup>23-25</sup>.

Die natürliche Bakterienflora schützt somit vermutlich vor chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Dies könnte auch ein möglicher Grund dafür sein, warum die Inzidenz von CED in höher entwickelten Ländern, in denen der hygienische Standard hoch und die Verwendung von Antibiotika weit verbreitet ist, im Verlauf der letzten Jahrzehnte anzusteigen scheint <sup>26</sup>.

Zusammenfassend lässt sich derzeit feststellen, dass die Ursachen für das Entstehen von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht bekannt sind, aber die Genese nicht mehr nur durch eine einfache Überreaktion des Immunsystems erklärt werden kann und

vermutlich multifaktoriell sein dürfte. Vielmehr scheint insbesondere die Pathogenese des Morbus Crohn zumindest zum Teil auf dem Vorhandensein spezifischer genetischer Mutationen zu beruhen, durch die die Antigenpräsentation beeinträchtigt wird und wodurch es zu einer vermehrten Aktivierung proinflammatorischer Faktoren kommt. Der primäre Defekt könnte dabei Antigen-präsentierende Zellen des Darms wie Epithelzellen, dendritische Zellen und Makrophagen betreffen, wobei sekundär T-Zellen durch (Fehl-) Aktivierung zum Unterhalt der chronischen Entzündung beitragen könnten<sup>8</sup>.

### 1.3 Regulatorische T-Zellen

Eine besondere Rolle für den Erhalt der immunologischen Homöostase wird den regulatorischen T-Zellen zugesprochen. Seit Anfang der 1980er Jahren wird vermutet, dass sich Subpopulationen von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen identifizieren lassen, die mit einer regulatorischen und immunsuppressiven Funktion versehen sind und es begannen intensive Forschungen, um diese Zellen näher zu charakterisieren.

1990 wurde beschrieben, dass bei Kindern, die unter CED litten, eine im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte Anzahl CD25<sup>+</sup>-Zellen in der intestinalen Lamina propria und in peripherem Blut nachgewiesen werden konnte<sup>27</sup>.

Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Untergruppe der T-Zellen, sog. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatorische Zellen im Mausmodell nach Transfer die Ausprägung der Colitis abmildern konnten<sup>28, 29</sup>.

In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese CD4<sup>+</sup>-Subpopulation in der Lage war, eine schwere Colitis abzuschwächen<sup>30</sup> bzw. durch Transfer dieser CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen in erkrankte Tiere sogar eine Heilung einer bereits bestehenden Colitis erzielt werden konnte, wobei sich die entzündlichen Infiltrate in der Lamina propria zurückbildeten und sich histomorphologisch die Darmschleimhaut normalisierte<sup>28</sup>. Dies konnte durch Transfer CD25- negativer CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten nicht erreicht werden.

Wie Abb.1.1 darstellt, entwickeln SCID-Mäuse nach Injektion von naiven CD45RB<sup>high</sup>-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine Colitis. Durch Kotransfer von CD45RB<sup>high</sup>-T-Zellen zusammen mit CD25<sup>+</sup>-T-Zellen konnte diese verhindert werden. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch die Rolle des Interleukin-10, eines bedeutsamen antiinflammatorischen Zytokins, das von regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) sezerniert wird

und im Folgenden noch näher erläutert werden soll. SCID-Mäuse, die mit  $CD45RB^{high}$ -T-Zellen und  $CD25^{+}$ -T-Zellen Interleukin-10-defizienter Mäuse rekonstituiert wurden, entwickelten jedoch dennoch eine Colitis. Ebenso zeigte sich, dass sich durch gleichzeitige Gabe eines Anti-Interleukin-10-Antikörpers der protektive Effekt kotransferierter  $CD45RB^{lo}$  Zellen – die normalerweise ebenfalls in der Lage sind die Entwicklung einer Colitis zu inhibieren – nicht beobachten lässt. Diese Beobachtungen unterstreichen die Wichtigkeit der antiinflammatorischen Wirkung von IL-10 bei der Entwicklung der chronischen Entzündung im Mausmodell.

Neben der immunomodulatorischen Wirkung bei CED werden  $T_{reg}$ -Zellen auch wichtige Aufgaben in der Kontrolle von Autoimmunerkrankungen und Tumorproliferation zugeschrieben.

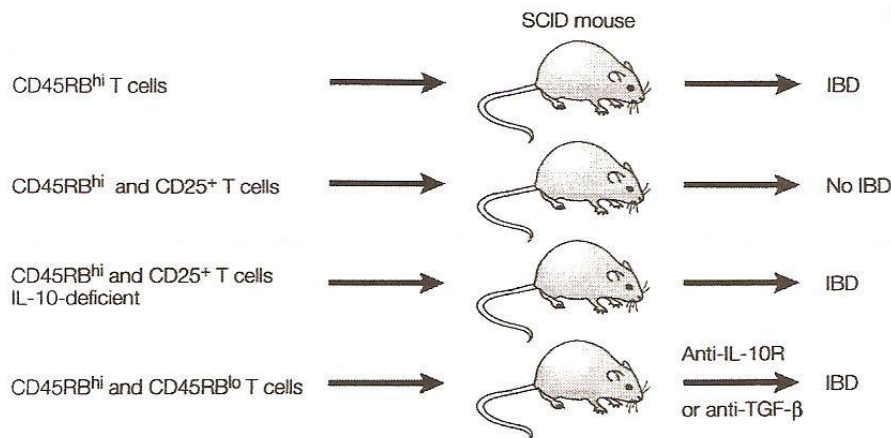


Abbildung 1.1 Das SCID-Transfer Model I: Übersicht über die Entwicklung einer chronischen Colitis nach Transfer verschiedener Zellpopulationen in SCID-Mäuse. (Abbildung übernommen aus Ethan M. Shevach  $CD4^{+}CD25^{+}$  Suppressor T Cells, Nature Review<sup>31</sup>, IBD = inflammatory bowel disease entspricht dem Begriff CED)

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass bei Nichtansprechen auf eine Tumorthherapie, durch Transfer von  $CD4^{+}CD25^{+}$ -Zellen die Empfindlichkeit des Tumors gegenüber der anti-proliferativen Therapie erneut gesteigert werden konnte<sup>32</sup>.

33.

Regulatorische T-Zellen, ihre Mediatoren und ihre Interaktion mit dendritischen Zellen (DCs) in Hinblick auf das Entstehen von CED stehen im Zentrum dieser Arbeit und sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

### 1.3.1 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen stellen eine Subpopulation der T-Lymphozyten dar. Die Bezeichnung CD leitet sich von der Cluster of Differentiation (CD)-Klassifizierung ab. Der Oberflächenmarker CD4 kennzeichnet alle T-Helfer-Zellen. CD25 ist Bestandteil der  $\alpha$ -Kette des Interleukin 2-Rezeptors, der sich insbesondere auf aktivierten T-Zellen nachweisen lässt. Die gleichzeitige Expression von CD4 und CD25 konnte dabei als ein Charakteristikum einer wichtigen Subgruppe regulatorischer T-Zellen identifiziert werden, wobei generell in den letzten Jahren auch weitere Oberflächenmarker die Lymphozyten mit regulatorischer Funktion definieren beschrieben wurden. Es werden zwei verschiedene Arten von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen unterschieden: Regulatorische T-Zellen, die in jedem Organismus „natürlicherweise“ vorkommen, sogenannte „natürliche regulatorische T-Zellen“, und T-Zellen, die erst als immunologische Reaktion auf die Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen generiert werden, sogenannte „adaptive regulatorische T-Zellen“.

Wie gezeigt werden konnte findet die Prägung der natürlichen regulatorischen T-Zellen mit Hilfe von körpereigenen Autoantigenen im Thymus statt, während die erworbenen regulatorischen T-Lymphozyten überwiegend in der Peripherie durch körpereigene Gewebsantigene oder Fremdanigene generiert werden. Gemeinsam ist ihnen, dass ihre Vorläuferzellen alle aus dem Thymus stammen. Beide Subpopulationen regulatorischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind auf die Anwesenheit des Zytokins IL-2 angewiesen. CD25 wird von den natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen stets hoch exprimiert. Die T-Zellen, die ihre Immunität in der Peripherie erwerben, weisen eine variable CD25-Expression auf. Beide Untergruppen der T-regulatorischen Zellen scheinen ihre Funktion durch direkten Zell-Zell-Kontakt und Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC) zu vermitteln. Ihre Funktion besteht im Wesentlichen darin, antiinflammatorische Zytokine, wie z. B. IL-10 und TGF- $\beta$ , zu sezernieren und die Proliferation von Effektorzellen zu inhibieren, wodurch aktivierte Immunreaktionen gebremst werden. Für die Funktion der adaptiven regulatorischen T-Zellen der Peripherie scheint die Zytokinsekretion eine entscheidende Rolle zu spielen, während die natürlich vorkommenden T-regulatorischen Zellen (T<sub>reg</sub>) auch ohne Zytokinausschüttung suppressive Effekte ausüben können<sup>34</sup>.

Dass tatsächlich das Vorhandensein regulatorischer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen, die bei autoimmunen Prozessen stattfindende Dysfunktion der Immunantwort bremsen kann, konnte außer bei chronisch entzündliche Darmerkrankungen auch in verschiedenen

Tiermodellen anderer autoimmuner Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 1 gezeigt werden <sup>35</sup>.

### 1.3.2 Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4

T-Lymphozyten mit regulatorischer Funktion werden zudem durch die Expression weiterer spezifischer Moleküle definiert. So konnte das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen 4 (CTLA4) identifiziert werden, welches in hoher Dichte auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup>-regulatorischen T-Zellen gefunden werden kann und essentiell für die immunregulatorische Funktion und Homöostase dieser Zellen ist, wobei es in der Lage ist eine T-Zell-Aktivierung zu inhibieren <sup>36</sup>. Dass das Vorhandensein dieses Rezeptors auch eine Rolle bei entzündlichen Darmerkrankungen zu spielen scheint, konnte dadurch gezeigt werden, dass nach Applikation eines CTLA-4 Antikörpers bei Mäusen die gleichzeitig CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen erhielten, die Entwicklung einer murinen Colitis durch Inhibition des suppressiven Effekts der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen nun nicht mehr verhindert werden kann <sup>37</sup>. Die Untersuchungen von Watanabe et al aus dem Jahre 2008 zeige, dass nach Blockade des CTLA-4 die regulative Wirkung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen in einem Maus-Colitismodell verloren geht. Die zunächst beobachtete Abschwächung der Colitis nach Hinzugabe von regulatorischen T-Zellen ist unter CTLA4-Blockade nicht mehr gegeben <sup>38</sup>.

### 1.3.3 Foxp3

Die fox/FOX-Proteine („fox“ bei Tieren, „FOX“ beim Menschen) sind wichtige Transkriptionsfaktoren, die die Expression bestimmter Gene steuern können, wobei die Abkürzung foxp für „forkhead box proteins“ steht. Foxp3/FOXP3 ist ein Transkriptionsfaktor, der überwiegend die Entwicklung und Funktion von natürlich vorkommenden aktivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen reguliert <sup>39</sup>. Die Bedeutung dieser Funktion wird durch das Vorhandensein von foxp3/FOXP3-Mutationen unterstrichen, die zu einem funktionellen Verlust des Transkriptionsfaktors führen und zu den schweren Immundefekten „Scurfy“ bei Mäusen und „IPEX“ (immune polyendocrine enteropathy – x linked syndrome) beim Menschen führen. Beide Syndrome gehen u. a. mit einer Colitis einher, die der intestinalen Entzündung bei CED ähnelt <sup>40-42</sup>. Somit scheint es ohne die regulierende Funktion des FOXP3-Gens zu einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu kommen, was die Bedeutung dieses

Transkriptionsfaktors und damit regulatorischer T-Zellen bei der Pathogenese von CED unterstreicht. Daher wird in der Literatur darüber diskutiert, ob das Vorhandensein FOXP3-positiver Zellen beim Menschen für die Regulation einer überschießenden intestinalen Immunantwort notwendig ist <sup>43</sup>. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich bei Mäusen die eine *foxp3*-Mutation besitzen Scurfy ausbildete <sup>40</sup>. Darauf aufbauend entstand die These, dass besonders stark aktivierte CD4<sup>+</sup>-Zellen durch die *foxp3*-Mutation nicht mehr regulatorisch tätig sein können <sup>44</sup>.

Aber auch der Transkriptionsfaktor *foxp3* scheint nicht das alleinige Kennzeichen regulatorischer T-Zellen zu sein, da er nicht von allen Lymphozyten mit regulatorischer Funktion exprimiert wird. Demzufolge müssen weitere Merkmale zur Charakterisierung der regulatorischen Zellen herangezogen werden.

### 1.3.4 $\alpha_E\beta_7$ -Integrin

Integrine sind spezielle Oberflächenmoleküle einer Zelle die auch als Transmembranproteine bezeichnet werden und zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle gezählt werden. Sie sind obligate Heterodimere, die sich aus zwei nicht-kovalent miteinander verbundenen Polypeptid-Ketten, den sogenannten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzen (Abb. 1.2). Die einzelnen Integrin-Subfamilien teilt man anhand der jeweils vorhandenen  $\beta$ -Kette ein, wobei ein Teil der  $\beta$ -Ketten mit mehreren  $\alpha$ -Ketten assoziieren kann, was die strukturelle Vielfalt weiter erhöht. Die meisten der  $\beta_1$ -Integrine, die auf Leukozyten exprimiert sind, vermitteln die Bindung dieser Zellen an extrazelluläre Matrix wie Fibronectin, Laminin und Kollagen, wobei andere Integrine noch zusätzlich Interaktionen mit zellulären Gegenrezeptoren aufweisen. Durch Interaktion mit dem jeweiligen Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, der extrazelluläre Molekülanteil ändert seine Konformation nach Aktivierung der Zelle und dadurch seine Affinität zum jeweiligen Rezeptor. Integrine stellen somit eine Möglichkeit der Zelle dar, auf Reize von extrazellulär zu reagieren und sind wichtiger Bestandteil von Signaltransduktionswegen.

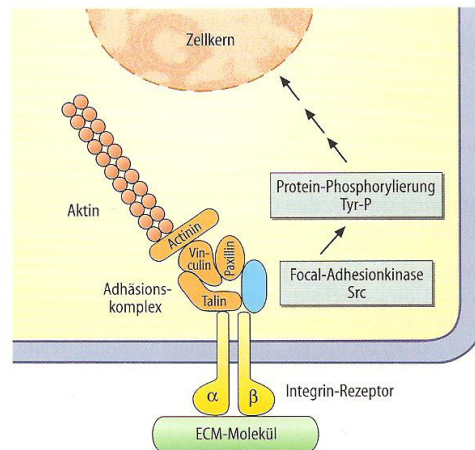


Abbildung 1.2 entnommen aus Löffler/Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie* S. 769, 7. Auflage, Springer-Verlag, Aufbau eines Integrins aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, das mit Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM) in Kontakt steht und mit seiner intrazellulären Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung steht und spezifische Proteinkinasen aktivieren kann

Das mukosale  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin (auch als CD103 bezeichnet), das zunächst als phänotypischer Marker für intraepitheliale T-Zellen (IEL) in intestinalem Epithel, der Haut- und Lungenepithelien galt <sup>45</sup>, konnte kürzlich als weiteres Charakteristikum  $CD4^+CD25^+$ -regulatorischer T-Zellen definiert werden. Das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin kann allerdings nicht nur auf IEL und  $CD4^+CD25^+$ -Zellen detektiert werden, sondern wird auch von  $CD8^+$  und DCs exprimiert <sup>45</sup>. Es scheint dabei eine gewisse Organspezifität zu existieren, da das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auffallend häufig auf intestinalen Lymphozyten nachgewiesen werden kann <sup>46</sup>, was eine wichtige Rolle dieses Integrins für die Interaktion intestinaler Immunzellen vermuten lässt.

Bislang ist als einziger Gegenrezeptor des  $\alpha_E\beta_7$ -Integrins E-Cadherin identifiziert worden, welches zu einer Gruppe von Calcium-abhängigen Zelladhäsionsmolekülen gehört, das auf epithelialen Zellen nicht aber in der Lamina propria detektiert werden kann <sup>47</sup>. Es wurde vermutet, dass die „Hauptaufgabe“ des  $\alpha_E\beta_7$ -Integrins darin besteht die Migration und Retention von Lymphozyten in die Mukosa zu ermöglichen <sup>48</sup>. Dass Integrine der  $\beta_7$ -Subpopulation (zu denen das  $\alpha_4\beta_7$ - und das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin gehört) tatsächlich für eine effektive Lokalisation von Lymphozyten im Gastrointestinaltrakt verantwortlich zu sein scheinen, konnte kürzlich gezeigt werden, da Mutationen im Integrin-Gen für die Untereinheit  $\beta_7$  in Tiermodellen zum Fehlen von Lymphozyten im Colon führten <sup>49</sup>.

$\alpha_E$ -defiziente Mäusen zeigen dabei eine reduzierte Anzahl nicht nur im intestinalen Epithel lokalisierter T-Zellen, sondern auch der in der Lamina propria identifizierten



Lymphozyten<sup>50</sup>. Dass das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin nicht allein für die regulatorische Aktivität von  $CD4^+CD25^+$ -T-Lymphozyten verantwortlich ist, konnte die Gruppe um Annacker zeigen, da auch  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen aus  $CD103$ -negativen Tieren in der Lage waren die Transfercolitis zu verhindern<sup>51</sup>.

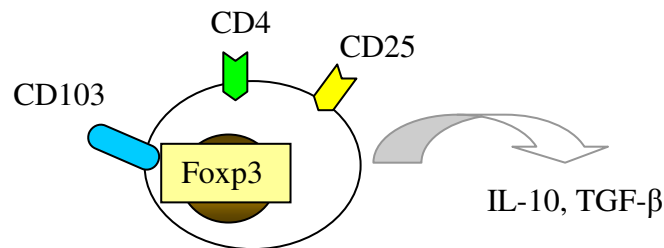


Abbildung 1.3 Illustration der beschriebenen Marker und Zytokine von  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen

## 1.4 Zytokine, die für die Funktion der regulatorischen T-Zellen eine wichtige Rolle spielen

Interleukine sind zelluläre Botenstoffe. Das Wort „Interleukin“ ist zusammengesetzt aus dem lateinischen Wort „inter“ für zwischen und dem griechische Wort „leukos“ für weiß/weiße Blutzelle. Interleukine sind Substanzen, die es den Zellen ermöglichen über eine Distanz indirekt Informationen an andere Zellen weiter zu geben.

In der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen spielen Zytokine eine tragende Rolle. Es wird vermutet, dass bei CED das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auf die Seite der proinflammatorischen Mediatoren (wie z. B. IL-1, IL-6, IL-8 und  $TNF\alpha$ ) verschoben ist<sup>52</sup>. Auf der Überlegung basierend, dass die Applikation bzw. die Stimulation der Produktion antiinflammatorischer Zytokine dabei das Ungleichgewicht dieser Zytokingruppen beseitigen könnte und damit die intestinale Entzündung gebessert werden könnte, rückten insbesondere zwei antiinflammatorische Zytokine, Interleukin-10 (IL-10) und der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des Interesses.

### 1.4.1 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) wird insbesondere von  $T_H2$ -Zellen, sowie  $CD4^+CD25^+$ -Zellen sezerniert, und unterdrückt die Produktion proinflammatorischer Substanzen wie z. B. Interleukin-2 und Interferon- $\gamma$ . Mäuse, denen das Gen für die IL-10-Produktion fehlt, entwickeln spontan eine schwere transmurale und granulomatöse chronische Colitis<sup>53</sup>,

die durch externe IL-10-Applikation im Tiermodell gemildert werden kann. Ob die IL-10 Produktion der regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen jedoch alleine die Funktion dieser Lymphozyten vermittelt, ist unklar. So konnte die Arbeitsgruppe um Thornton zeigen, dass Antikörper, die gegen IL-10 gerichtet waren, die suppressive Wirkung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen nicht unterdrücken konnten, was die Vermutung nahe legt, dass die regulatorische Funktion der Zellen ggf. über direkte Zell-Zell-Kontakte und nicht allein über die Zytokin-Sekretion vermittelt wird <sup>54</sup>. Die Rolle, die IL-10 bei der regulatorischen Wirkung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen einnimmt, ist somit noch nicht ausreichend geklärt.

### 1.4.2 TGF- $\beta$

Neben IL-10 scheint auch der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) als antiinflammatorischer Mediator für die Funktion von regulatorischen T-Zellen wichtig zu sein <sup>55, 56</sup>. 1986 wurde seine regulierende Aktivität zunächst bei der Immunantwort von B-Lymphozyten beschrieben <sup>57</sup>.

TGF- $\beta$  wird von zahlreichen unterschiedlichen Zellpopulationen sezerniert und auch die Expression seines Rezeptors wurde auf den unterschiedlichsten Zellenarten beschrieben. Es handelt sich dabei um ein Zytokin, das die Aktivierung der spezifischen Immunabwehr inhibiert. Die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen wird vermindert und damit eine übermäßige Entzündung verhindert.

Wie gezeigt werden konnte, spielt es bei verschiedenen chronisch entzündlichen Erkrankungen eine wesentliche Rolle. So wurde beschrieben, dass es bei TGF- $\beta$ 1-knock-out-Mäusen aufgrund einer überschießenden Lymphozyteninfiltration zu multifokalen Entzündungen in sämtlichen Organen u. a. auch im Colon kommt <sup>58</sup>. Experimente in der Transfer-Colitis mit anti-TGF- $\beta$ -Antikörpern und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen lassen vermuten, dass die Anwesenheit von TGF- $\beta$  für die Funktion der T-Zellen als regulatorische Zellen wichtig ist, da ohne das Vorhandensein von TGF- $\beta$  bei Kottransfer von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>-Zellen, eine Colitis nicht verhindert werden konnte <sup>36</sup>.

## 1.5 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) gehören zu den Antigen präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems. Ihr Name leitet sich von dem lat. Wort „dendriticus“ für verzweigt ab. Namensgebend sind ihre verzweigten Zytoplasma-Ausläufer (Abb. 1.4). DCs besitzen im Wesentlichen zwei Aufgaben: zum einen die Antigenpräsentation und zum anderen die Stimulation von Lymphozyten, insbesondere von T-Lymphozyten<sup>59</sup>. DCs sezernieren u. a. das proinflammatorisch wirkende Interleukin-12<sup>60</sup>.

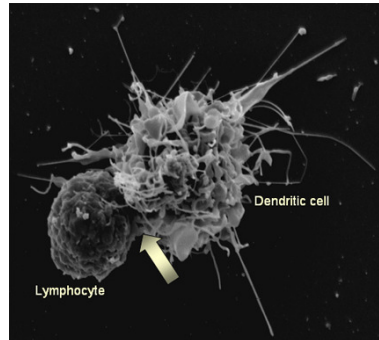


Abbildung 1.4 Elektronenmikroskopische Abbildung einer dendritischen Zelle und eines Lymphozyten, Department of Pathology, University of South California

DCs tragen auf ihrer Oberfläche – wie alle APC – das Major Histocompatibility Complex (MHC)-Molekül der Klasse 2. Über die MHC2-Moleküle werden extrazelluläre Proteine präsentiert, die von  $CD4^{+}$ -T-Zellen erkannt werden können.

Man unterscheidet zwischen naiven und reifen DCs. Dabei finden sich naive DCs vorwiegend in den peripheren Geweben, wo sie nach aktiver Antigen-Akquisition ihren Phänotyp verändern und anschließend einen Reifungsprozess durchlaufen. Die reifen DCs migrieren zu lokalen lymphatischen Geweben um dort das entsprechende Antigen naiven Lymphozyten zu präsentieren, die in der Folge proliferieren und eine spezifische T-Zell-Antwort gegenüber dem jeweiligen Antigen generieren. Auf der Oberfläche reifer muriner DCs befinden sich u.a. die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86, deren Expression bei Aktivierung dieser Zellen hochreguliert wird und die für die suffiziente Antigenpräsentation gegenüber T-Lymphozyten und Induktion der spezifischen T-Zell-Antwort notwendig sind. Wie in den letzten Jahren gezeigt werden konnte existieren zahlreiche DC-Subpopulationen, die über die Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren charakterisiert werden. In der Maus lassen sich DCs über die Expression von CD11c identifizieren.

Die Rolle der DCs bei CED ist derzeit noch relativ unklar. Eine wesentliche Rolle scheint jedoch der dysregulierten Interaktion antigen-präsentierender dendritischer

Zellen (DCs) mit T-Lymphozyten zu kommen. DCs im Darm spielen nicht nur wie in anderen Geweben eine wesentliche Rolle bei der Präsentation bakterieller Antigene und Induktion einer aktiven Immunantwort sondern sind im gesunden Organismus auch in die Vermittlung einer peripheren Toleranz gegenüber Bestandteilen der luminalen Darmflora involviert, die wesentlich für die immunologische Homöostase im Darm ist. Dabei sammeln sie luminales Antigen und transportieren dies sowie apoptotische Epithelzellen zu mesenterialen Lymphknoten<sup>61</sup>. Zudem sind – wie kürzlich gezeigt werden konnte – mukosale DCs in der Lage CCR9<sup>+</sup>α<sub>4</sub>β<sub>7</sub><sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Effektor-T-Zellen zu generieren, die wiederum spezifisch in die Darmmukosa migrieren<sup>51</sup>.

Es wird angenommen, dass intestinale DCs im Verlauf einer Colitis keine Toleranz gegenüber luminalen Antigenen vermitteln wie im gesunden Darm, sondern die Generierung und Expansion von Effektor-T-Zellen induzieren. Durch Inhibierung der IL-12-Funktion kann die Toleranz im Tiermodell wieder hergestellt werden. In einer Vielzahl experimenteller Colitismodelle ist die intestinale Entzündung zudem unter keimreduzierten Bedingungen deutlich milder ausgeprägt<sup>62, 63</sup>. Dies unterstreicht die Bedeutung einer adäquaten Antigenpräsentation durch DCs für die intestinale Homöostase und legt die Involvierung einer fehlregulierten Interaktion von DCs mit T-Lymphozyten in die Pathogenese chronischer intestinaler Entzündungen nahe.

Intestinalen DCs, die an der Kreuzung "Toleranz versus Immunität" ihre Funktion versehen, scheint damit eine entscheidende, bislang jedoch nur wenig verstandene, Rolle beim Pathomechanismus chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu zukommen.

Wie jedoch gezeigt werden konnte finden sich bei Mäusen, die eine chronische Colitis aufweisen eine erhöhte Anzahl aktivierter DCs in der Lamina propria des Colons<sup>28, 64</sup>. Zudem lassen sich noch vor der klinischen Manifestation einer Colitis, T-Zellen und DCs im Colon in Clustern kolokalisiert vorfinden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Interaktion dieser Zellen wesentlich an der Pathogenese der chronischen Colitis beteiligt ist<sup>65</sup>.

## 1.6 Arbeitshypothese und Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit regulatorischen  $CD4^+CD25^+$ -T-Lymphozyten und ihrem Einfluss auf dendritische Zellen.

Eine Theorie zur Pathogenese von CED besagt, dass es durch fehlende Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe oder der kommensalen Flora zu einer fehlerhaften Immunantwort kommt, die zu einer chronischen Entzündung führt. Bisher war gezeigt worden, dass  $CD4^+CD25^+$ -regulatorische T-Zellen eine Entzündung, wie sie auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu finden ist, abschwächen können<sup>35</sup>.

Zentrale Aufgabe dieser Arbeit war es, regulatorische  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen aus verschiedenen Gewebearten der Maus zu isolieren, genauer zu charakterisieren und ihre Funktion in Darmentzündungsmodellen zu untersuchen. Um dies mit den Vorgängen in gesundem Gewebe zu vergleichen, erfolgte die Isolation zunächst aus gesundem Gewebe und anschließend aus an Colitis erkrankten Mäusen.

> Die erste Hypothese dieser Arbeit lautete, dass regulatorische  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen in Milz, mesenterialen Lymphknoten und insbesondere in der Lamina propria gesunder und an Colitis erkrankter Tiere vorkommen.

> Dass sich regulatorische T-Zellen nicht nur alleine durch die Positivität für CD25 auszeichnen, sondern sich ihre regulatorische Aktivität auch anhand von foxp3 und  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin nachweisen lässt, war eine weitere grundlegende Hypothese dieser Arbeit.

> Nachdem für die Immunantwort eines Organismus das Zusammenspiel von T-Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen von großer Bedeutung ist und über die Interaktion von regulatorischen  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen und dendritischen Zellen derzeit wenig bekannt ist, sollte ferner überprüft werden, ob regulatorische T-Zellen auch einen regulierenden, Toleranz induzierenden Einfluss auf dendritische Zellen besitzen. Dies sollte mithilfe von Kokultur-Experimenten untersucht werden.

Die Bestätigung dieser dritten Arbeitshypothese, nämlich dass regulatorische T-Zellen auch immunoregulatorisch auf Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen wirken, würde ein neues Prinzip in die Immunologie einführen und eine weitere Vernetzung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem bestätigen.

Ziel der Arbeit sollte insgesamt sein, ein besseres Verständnis für die immunologischen Vorgänge bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu gewinnen, um in Zukunft neue Therapien zur Behandlung entwickeln zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Labormaterialien und Geräte

- AutoMACS Miltenyi Biotec, Gladbach, Deutschland
- Heraeus Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech, Osterode am Harz, Deutschland
- Biofuge® fresco, Heraeus Sepatech, Osterode am Harz, Deutschland
- Brutschrank Heraeus 6000, Heraeus Sepatech, Osterode am Harz, Deutschland
- Sterilbank Laminar Flow, Heraeus Sepatech, Osterode am Harz, Deutschland
- Mikroskop, Leica, Wetzlar, Deutschland
- EPICS® XL-MCL Durchflusszytometer Beckman Coulter®, Krefeld, Deutschland
- Gilson pipetman, Gilson Inc., Middleton, WI, USA
- Eppendorf Pipetten, Hamburg, Germany
- Transferpette®-8, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
- TRIO-Thermoblock, BIOMETRA, Göttingen, Deutschland
- ritips®, Ritter Laborbedarf, Schwabmünchen, Deutschland
- Biosphere Filterspitzen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Rundbodenwell-Platten: Nunc™ Nunclon™ Delta Surface; CAT. No.: 163350; Batch No.: 065728, Nunc™ GmbH und Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
- Zählkammer, LO-LaborOptik, Friedrichsdorf, Deutschland
- 2ml Spritzen Discardit II™, Becton Dickinson, Fraga, Spanien
- 15ml Falcon™, konische Polystyrene-Röhrchen, Blue Max™ Jr., Ref: 352095, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
- 50ml Falcon™, konische Polypropylen-Röhrchen, Blue Max™, Ref. 352070, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
- 70µm Zellfilter, Ref. 352350, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
- 60 x 15mm Petrischalen Easy Grip 35 3004, Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
- SPECTRAflour plus, Tecan Trading AG, Schweiz

## 2.1.2 Chemikalien

- Albumin aus Rinderserum (BSA) Fraktion V 01400, Lot: 1732, Mr 67.000, Biomol GmbH Hamburg, Deutschland
- B-Aktin-Primer S 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3', MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
- B-Aktin-Primer A 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3', MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
- CpG-Oligodeoxynucleotide (ODN) 1668 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3', Metabion, Martinsried, Deutschland
- Fetales Kälberserum (FCS), Sigma®- Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
- Kollagenase, Clostridiopeptidase A; EC 3.4.24.3, Type I, C-0130, Sigma®-Aldrich Company Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- DNase I aus Rinderpankreas, Roche Diagnostics GmbH, Basel, Schweiz
- Foxp3-Primer 1, 5'-CAG CTG CCT ACA GTG CCC CTA G-3', Prod.-Nr. 415241, TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
- Foxp3-Primer 2, 5'-CAT TTG CCA GCA GTG GGT AG-3, Prod.-Nr. 415242 TIB Molbiol, Berlin
- Hank's balancierte Salz-Lösung modified (10x), H-4385, Sigma®-Aldrich Company Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Hyaluronidase aus Rinderhoden, EC3.2.1.35, Type I-S H-3506, Sigma®-Aldrich Company Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- RPMI-1640; Ref.: R8758, Sigma®-Aldrich Company Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Hank's BSS (1x) ohne Ca- & Mg-Ionen, Cat-Nr. H15-010 PAA Laboratories GmbH
- Percoll™ 1,130g/ml, 17-0891-02, Amersham Bioscience
- D-PBS – CaCl<sub>2</sub> – MgCl<sub>2</sub>, Lot: 3101663, Ref: 14190-094, Gibco™, invitrogen Paisley PAA, Schottland
- Cytofix/Cytoperm CAT: 51-2090KZ (554722), BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA
- Perm/Wash™ Buffer (100x) CAT No.: 51-2091KZ (554723), BD Pharmingen™, San Diego, CA, USA

- Trypanblau Lösung (0,4%), Lot 84K2371, Sigma®-Aldrich Company Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin 100x, Cat No.: P11-010, Lot No.: P01005-0599, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Turks Lösung, Lot: OB 265407, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Paraformaldehyd P-6148, Lot 85H0446, Sigma®, St. Louis USA
- Hepes Art.-No. 9105.4 Pufferan® > 99% für die Gewebezucht C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S, M = 238,31 g/mol, Charge 06357312, EG 2309079, Carl Roth® GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland
- Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulations-Faktor (GM-CSF), Maus; rekombinant, G0282-5UG, 055K1381, Sigma®-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- RiboGreen® RNA Quantitation Kit, R-11490, Molecular Probes Europe BV, 2333 AA Leiden, Niederlande
- RNeasy® Mini Kit (250), Cat. No 74106, Lot. No. 11877030, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- QIAshredder™ (250), Cat. No. 79656, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- RNase free DNase Set (50), Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- Beadlyte® Maus Multi-Zytokin Flex Kit (48-554 to 48-565), Upstate®, Temecula, CA

## 2.1.3 Antikörper

### 2.1.3.1 Antikörper für die FACS-Messungen

Tabelle 2.1 Übersicht über die für die FACS-Messungen verwendeten Antikörper

Antikörper	Markierung	Klon	Antigen	Spezies	Konz.
CD16/CD32	ohne	2.4G2	Fcγ III/II Rezeptor	Ratte anti-Maus Antikörper	0,5 mg/ml
IgG2b, κ	FITC	MPC-11	Isotypen-Kontrolle	Maus anti-Maus Antikörper	0,5 mg/ml
CD4	FITC	RM4-5	L3T4	Ratte anti-Maus Antikörper	0,5 mg/ml
CD8a	FITC	53-6.7	Ly-2	Ratte anti-Maus Antikörper	0,5 mg/ml
CD11b	FITC	M1/70	IntegrinαM Kette Mac-1α	Ratte anti-Maus Antikörper	0,5 mg/ml
CD11c	FITC	HL3	Integrinαx Kette	Hamster anti-Maus Antikörper	0,5 mg/ml
CD40	FITC	3 23	anti-CD40	Ratte anti-Maus Antikörper	0,5 mg/ml
CD80	FITC	16-10A1	anti-CD80	Ratte anti-Maus Antikörper	0,5 mg/ml



CD86	FITC	GL1	anti-CD86	Ratte anti-Maus Antikörper	0,5 mg/ml
MHC II	FITC	2.G9	MHC II-Rezeptor	Ratte anti-Maus Antikörper	0,5 mg/ml
IL-10	FITC	JES5 16E3		Ratte anti-Maus Antikörper	0,1 mg/ml
ham IgG1	PE	A19-4	Isotypen-Kontrolle	Hamster anti-Maus Antikörper	0,1 mg/ml
IgG2a, $\kappa$	PE	R35-95	Isotypen-Kontrolle	Ratte anti-Maus Antikörper	0,2 mg/ml
CD11c	PE	HL3	Integrin $\alpha$ X Kette	Hamster anti-Maus Antikörper	0,2 mg/ml
CD25	PE	PC61	IL-2 Rezeptor $\alpha$ Kette	Ratte anti-Maus Antikörper	0,2 mg/ml
CD45rb	PE	C363.16A	anti-CD45	Ratte anti-Maus Antikörper	0,2 mg/ml
CD62L	PE	MEL-14	L-Selektin	Ratte anti-Maus Antikörper	0,2 mg/ml
CD103	PE	m290	Integrin $\alpha$ , E Kette	Ratte anti-Maus Antikörper	0,2 mg/ml
FoxP3	PE	NRRF-30		Ratte anti-Maus Antikörper	0,2 mg/ml
IL-12	PE	C15.6		Ratte anti-Maus Antikörper	0,1 mg/ml

Alle FITC- und PE markierten Antikörper wurden mit Ausnahme des FoxP3-Antikörpers (eBioscience, San Diego, USA) von BD Bioscience Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland bezogen.

### 2.1.3.2 Antikörper für die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Isolierung

Miltenyi Biotec CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Isolierungs-Kit für regulatorische T-Zellen der Maus;  
Bestell-Nr.: 130-091-041; Lot. Nr.: 5050629047

Tabelle 2.2 Zusammensetzung des Miltenyi Biotec CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Isolierungs-Kits

Menge	Bezeichnung	Beinhaltete Antikörper
1 ml	Biotin-Antikörper Cocktail	CD8a (Ly-2; Isotyp: Ratte IgG2a)
		CD11b (Mac-1; Isotyp: Ratte IgG2b)
		CD45R (B220, Isotyp: Ratte IgG2a)
		CD49b (DX5; Isotyp: Ratte IgM)
		Ter-119 (Isotyp: Ratte IgG2b)
2 ml	Anti-Biotin MicroBeads	MicroBeads, die an monoklonale Anti-Biotin-Antikörper gebunden sind (Klon Bio3-18E7.2; Isotyp: Ratte IgM)
1 ml	CD25-PE	monoklonaler Anti-Maus CD25-Antikörper, an PE-konjugiert (Klon 7D4; Isotyp: Ratte IgM)
1 ml	Anti-PE MicroBeads	MicroBeads, die an monoklonale Anti-PE-Antikörper gebunden sind (Isotyp: Maus IgG1)

### 2.1.3.3 Antikörper für die CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>-Isolierung

Tabelle 2.3 Übersicht über die verwendeten Antikörper für die CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>-Isolierung

Antikörper	Klon	Konz.	Hersteller
anti-mouse MHC II	2.G9	0,5 mg/ml	BD Pharmingen™
anti-mouse CD8a	Ly-2, 53-6.7	0,5 mg/ml	BD Pharmingen™
anti-mouse CD11b	M1/70	0,5 mg/ml	BD Pharmingen™
anti mouse CD45RB	B220 RA3-6B2	0,5 mg/ml	BD Pharmingen™
goat-anti-rat IgG MicroBeads			Miltenyi Biotec Inc.

Weitere Antikörper:

Anti-IL-10-Antikörper m-IL-10-Antikörper Ratte IgG, Klon 2A5.7 2 mg/ml, 0,5 ml aus eigener Herstellung

### 2.1.4 Häufig verwendete Puffer und Medien:

PBS 10x:

80 g NaCl + 2 g KCl + 21,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O + 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Dest. H<sub>2</sub>O auf pH 7,2 einstellen und ad 1,0 l auffüllen.

Durch 1 : 10 Verdünnung mit destilliertem H<sub>2</sub>O 1x PBS herstellen.

ACK-Puffer 10x:

82,9 g Ammoniumchlorid NH<sub>4</sub>Cl (10 x 155 mM) + 10 g Kaliumhydrogencarbonat KHCO<sub>3</sub> (10 x 10 mM) + 20 ml 0,5 M EDTA-Lösung pH = 8,0 auf 1,0 l mit dest. H<sub>2</sub>O auffüllen, davon 1x Puffer herstellen

Waschpuffer für die Automacs-Separation:

1x PBS, 2M EDTA

Laufpuffer für die Automacs-Separation:

1x PBS, 2M EDTA, 0,5% BSA

Färbepuffer für die FACS-Färbungen:

500 ml PBS (1x)

3% FCS

0,09% Natriumazid

TEA-Puffer (50x):

2M Tris/Acetat pH 8,0

50mM EDTA pH8,0

Medium für Isolierung und Kultur von dendritischen Zellen, Milzzellen und mesenterialen Lymphknotenzellen

500 ml RPMI-1640 + 50 ml FCS + 5ml Pen/Strep + 500µl β2-Mercaptoethanol

HEPES-Medium für die Lamina propria Lymphozyten-Isoation:

500 ml RPMI-1640 + 10 ml 1M HEPES + 10ml FCS + 5ml Pen/Strep

### **2.1.5 Verwendete Software:**

Expo™32 ADC Software, Beckman Coulter®, Krefeld, Deutschland

Microsoft Excel Office 2003

WinMDI 2.8

SigmaPlot 8.0

Reference Manager 10.0

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Generierung dendritischer Zellen (DCs) aus dem Knochenmark

An Tag 1 wurden einer gesunden Balb/c Maus beidseitig Femur, Tibia und Fibula entnommen und diese in 20 ml steriles PBS (1x) transferiert. Unter sterilen Bedingungen wurden in einem zweiten Schritt die Knochen mit Hilfe eines Mörsers zermahlen, in PBS aufgenommen und durch einen 70 µm Filter in ein 50 ml Falcon-Gefäß gegeben. Die Zellen wurden dann bei 1200 Umdrehungen 8 min lang bei 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 10 ml Medium (RPMI-1640 + 10% FCS + 5 ml Pen/Strep + 500 µl β-Mercaptoethanol) aufgenommen und 10 µl dieser Zellsuspension nach 3 - 5 min Inkubation mit 90 µl Türkischer Lösung, die zur Lyse der Erythrozyten diente, zur Auszählung der Gesamtzellen verwendet. Für die anschließende Zellkultur wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale ausgesät. Das oben genannte Medium musste zusätzlich mit GM-CSF versetzt werden (Konz. 200 U/ml), um die Ausreifung und das Wachstum der dendritischen Zellen zu unterstützen. Jede Petrischale wurde mit 10 ml Medium gefüllt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Am Tag 4 wurden die Petrischalen mit je 10 ml zusätzlichem frischem Medium versetzt. Am Tag 7 wurden zunächst 10 ml des alten Mediums entnommen und die Zellen dann wieder mit jeweils 10 ml frischem Medium versorgt. Der Mediumwechsel wurde schonend durchgeführt, um eine frühzeitige Aktivierung der DCs durch Auf- und Abpipettieren zu vermeiden.

### 2.2.2 Isolierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen aus der Milz

Um ausreichend CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen isolieren zu können wurden im Durchschnitt 9-10 Mäuse pro Experiment benötigt. Die Milz der Tiere wurde entnommen und max. jeweils 2½ Milzen in 2 x 50 ml Medium (RPMI-1640 + 10% FCS) aufgenommen. Anschließend wurden die Milzen nach und nach in einer kleinen Petrischale mit dem Stempel einer 2 ml-Spritze zerdrückt, um eine Einzelzell-Suspension zu erhalten. Um Gewebsreste zurückzuhalten wurde die Zellsuspension anschließend durch ein 70 µm Filter in je ein 50 ml Gefäß überführt. Die Falcon-Gefäße wurden dann bei 1600 Umdrehungen für 15 min bei 4°C zentrifugiert, die Überstände verworfen, das Pellet

aufgeschüttelt und je 50 ml-Behälter mit 20 ml kaltem ACK-Puffer (1x) versetzt. Die Erythrolyse erfolgte anschließend für 10 min auf Eis. Das Abstoppen der Reaktion fand mit mind. 20 ml FCS-haltigem Medium statt. Anschließend wurde die Suspension bei 1600 Umdrehungen für 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml Waschlösung (PBS (1x) + 5% BCS) resuspendiert. An dieser Stelle konnten nun die einzelnen Falcon-Röhrchen zusammengefügt und die Gesamtzellzahl bestimmt werden.

Im nächsten Schritt schloss sich die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Isolierung mit Hilfe des Miltenyi MACS-Kit (s.o.) an:

Pro 10<sup>7</sup> Zellen wurden die Gesamt-Milz-Zellen (GMZ) in 40 µl Waschlösung resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Biotin-Antikörper-Cocktail pro 10<sup>7</sup> Zellen rotierte das Gefäß 10 min lang im Kühlraum bei 4°C. Danach wurden jeweils 30 µl Waschlösung, 20 µl Anti-Biotin-MicroBeads, 10 µl CD25-PE-AK pro 10<sup>7</sup> Zellen hinzugefügt und die Zellen ein weiteres Mal für 15 min bei 4°C inkubiert. Bevor die Zellen separiert werden konnten, wurden sie mit 1 - 2 ml Waschlösung pro 10<sup>7</sup> Zellen versetzt, 10 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl Waschlösung pro 10<sup>8</sup> Zellen aufgenommen. Das AutoMACS-Programm „depl-025“ führte eine Negativ-Selektion durch. Dabei wurden zunächst alle markierten CD4-negativen Zellen an die magnetische Säule gebunden, so dass die CD4-positiven Zellen aufgefangen werden konnten. Im nächsten Schritt wurden die CD4-negativen Zellen von der Säule gewaschen und ebenfalls separat aufgefangen.

Die folgenden Schritte wurden nur noch mit den CD4<sup>+</sup>-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zunächst in 90 µl Waschlösung pro 10<sup>7</sup> Zellen aufgenommen und mit 10 µl Anti-PE MicroBeads pro 10<sup>7</sup> Zellen versetzt. Die Zellsuspension wurde für 15 min im Kühlraum in einen Rotor gestellt. Nach einem Waschschrift mit 1 - 2 ml Waschlösung pro 10<sup>8</sup> Zellen und Zentrifugation mit 1600 Umdrehungen für 10 min bei 4°C wurde das Pellet in 500 µl Waschlösung pro 10<sup>8</sup> Zellen aufgenommen. Das AutoMACS-Programm „possel-d2“ führte nun eine Positiv-Selektion durch, wobei die markierten CD25-positiven Zellen an die magnetische Säule gebunden wurden. Mit diesem Schritt ließen sich zunächst die CD4<sup>+</sup>

CD25<sup>-</sup> Zellen als Kontrolle auffangen und nach Ausschaltung des magnetischen Feldes, in dem sich die Säule befand, konnten separat die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen eluiert werden.

### **2.2.3 Isolierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten**

Die mesenterialen Lymphknoten (mLK), die sich hauptsächlich am ileocecalen Übergang befanden, wurden im Gewebsverbund entnommen und zunächst mechanisch aus dem umgebendem Fettgewebe frei präpariert. Im Folgenden wurden sie in einer mit Medium gefüllten Petrischale mit dem Stempel einer Spitze zerdrückt und durch ein 70 µm Sieb filtriert. Da die Lymphknoten annähernd frei von Erythrozyten waren, war ein Lyseschritt mit ACK-Puffer nicht nötig, so dass mit den Zellen nach der Zentrifugation analog der Aufreinigung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen der Milz fortgeföhren werden konnte.

### **2.2.4 Isolierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen aus der Lamina propria mucosae**

Den Mäusen wurde nach Eröffnung des Abdomens durch einen V-Schnitt das gesamte Colon entfernt und zunächst in einer Schale mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Colon mit einer Knopfschere der Länge nach aufgeschnitten und der Kot entfernt. Es folgte ein zweiter Waschschrift, indem der Darm kurz in einem Falcon-Gefäß mit PBS geschüttelt wurde, um noch anhaftende Kotreste zu entfernen. Danach wurde der Darm in 0,5 - 1 cm lange Stücke geschnitten und kam in einen mit HEPES-Medium gefüllten sterilen Becher (max. 2½ Dörme pro Behälter). Die Darmstücke wurden im Becher nun 20 - 30 min bei 37° C im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurden sie über ein Metallsieb gegeben und das aufgefangene Medium verworfen. Die Darmstücke kamen nun in ein 50 ml Gefäß mit 20 ml Medium und wurden 20 sec kräftig geschüttelt. Dies wurde noch zweimal wiederholt, um die Epithelzellen zu entfernen. Der die abgelösten Epithelzellen enthaltende Überstand wurde jeweils verworfen.

Nach dem Auswaschen der intraepithelialen Lymphozyten wurden die Stücke von jeweils 2 ½ Dörmen in ein Becherglas mit 40 ml 1xHBSS + EDTA gegeben (10 ml HBSS + 40 µl 0,5 M EDTA) und 20 min bei 37°C geröhrt. EDTA wurde zugefügt, um Ca<sup>2+</sup> Ionen, die für die Zell-Zell-Verbindung über Adhäsionsmoleküle wichtig sind, abzufangen und damit verbleibende Epithelzellen von der Basalmembran abzulösen. Die Darmstücke wurden dann wieder über das Sieb gegeben und erneut in 40 ml HBSS

(diesmal ohne EDTA) überführt und weitere 10 min gerührt. Anschließend wurde der Darm kurz in komplettem Medium gespült.

Die Darmstücke wurden dann auf Parafilm 1 min lang mit einer Schere mechanisch zerkleinert und somit für den Verdau vorbereitet. Pro 2,5 Därm wurden 21,5 ml RPMI-Medium (ohne Zusätze), 20% FCS, 1 mg/ml Kollagenase, 2 mg/ml Hyaluronidase und 0,3 mg/ml DNase benötigt. Kollagenase und Hyaluronidase wurden dazu verwendet, die extrazelluläre Matrix zu spalten. Die DNase hatte die Aufgabe, freigesetzte DNA zu spalten. Der 90minütige Verdau bei 37°C wurde nach 45 min kurz unterbrochen, um die Darmstücke mit Hilfe einer Spritze erneut mechanisch auf und ab zu scheren. 10 min vor Ablauf der Zeit wurde jedes Becherglas mit 0,5M EDTA versetzt. Nach dem Verdau wurden die Därm ein zweites Mal durch die Spritze geschert, die Zellsuspension über einen 70 µm Filter gegeben und der Verdau mit FCS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde im folgenden Schritt bei 300 g 10 min lang zentrifugiert. Die Pellets wurden nun gepoolt und ein zweites Mal zentrifugiert. Die anschließende Aufreinigung mononukleärer Zellen geschah mit Hilfe eines Dichtegradienten. Hierzu wurde gebrauchsfertige Percoll™-Lösung verwendet. Der verwendete Percoll bestand aus Silicapartikeln, die mit Polyvinylpyrrolidon beschichtet waren und hatte eine Dichte von 1,130 g/ml. Das Prinzip der Zellseparation mit Hilfe eines Dichtegradienten beruht darauf, dass die erwünschten Zellen, die eine geringere Dichte besitzen als das Medium, sich oberhalb dieses Mediums ablagern und dort als Interphase sichtbar werden. Zellen, die eine höhere Dichte besitzen, wie z.B. Erythrozyten, sinken zu Boden (siehe Abb. 2.1).

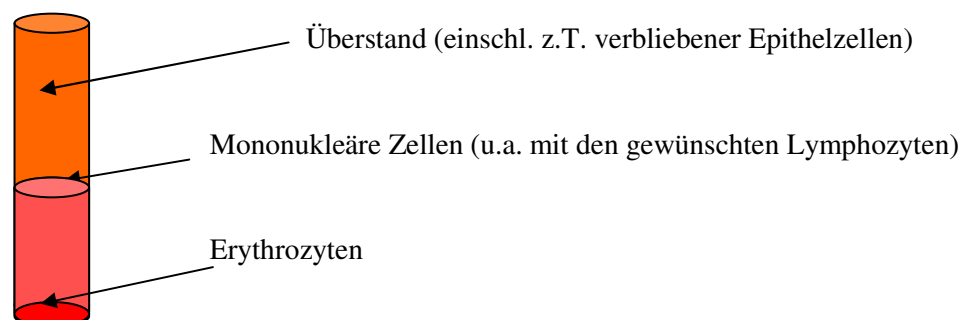


Abbildung 2.1 Schematische Abbildung der Verteilung der einzelnen Zellen aufgrund ihrer Dichte nach Zentrifugation der Zellsuspension im Percoll™-Dichtegradient

Zunächst wurde ein 100%iger Percoll aus 50 ml Percoll™-Lösung, 4,33 ml 10x HBSS, 220 µl 1N HCl (= 36,46 g/mol) und 500 µl 1M HEPES hergestellt. Aus dem 100%igen Percoll wurden ein 66%iger und ein 44%iger Percoll hergestellt, da die Zellen pro Darm

in 8 ml 44%igem Percoll resuspendiert und mit 2 ml 66%igem Percoll unterlegt werden sollten. Die Zellen wurden dann bei 2500 Umdrehungen ohne Bremse 20 min bei 24°C zentrifugiert, um eine Auftrennung mit Hilfe des Dichtegradienten zu ermöglichen. Nach der isopyknischen Zentrifugation, d.h. Anreicherung auf einer dichtekonstanten Phase, wurde vorsichtig die Interphase, in der sich nun die mononukleären Zellen angereichert hatten, abgenommen. Es schloss sich ein Waschschriff mit sterilem Medium an, um Reste des zytotoxischen Percolls möglichst vollständig zu entfernen. Danach konnten die Zellen gezählt werden. Wie auch bei den Milz-Lymphozyten erfolgte nun die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Isolierung mit dem Miltenyi CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Kit. Pro 10<sup>7</sup> Zellen wurde dasselbe Volumen an Biotin-Antibody-Cocktail, Anti-Biotin-MicroBeads, CD25-PE-AK und Anti-PE MicroBeads benötigt wie oben beschrieben. Die Isolierung wurde wiederum mit den AutoMacs-Programmen „depl025“ und „posseld2“ durchgeführt.

### **2.2.5 In vitro-Stimulation mit anti-CD3 und IL-2 zur Beurteilung der Zytokinsekretion**

Ein Teil der isolierten Gesamtzellen, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen wurde in IL-2 haltigem Medium (50 U/l) aufgenommen und auf eine 24 h zuvor mit Anti-CD3-Antikörper (2,5mg/ml) gecoatete 96-Well-Platte gesät, so dass sich jeweils 0,2 x 10<sup>6</sup> Zellen mit 200 µl IL-2-Medium in jedem Well befanden. Die Zellen wurden 24 h lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Überstände abgenommen und zunächst bei -20°C eingefroren. Die Messung der im Überstand befindlichen Zytokine erfolgte mittels Luminex und ELISA.

### **2.2.6 Kokultur**

Die isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen wurden noch am gleichen Tag mit den DCs in Kokultur gebracht. Dazu wurde die benötigte Anzahl an T-Zellen zweimal mit sterilem Medium gewaschen und das Pellet dann in dem entsprechenden Volumen an Medium aufgenommen, um 4 x 10<sup>6</sup> Zellen in 250 µl zu erhalten. Die DCs, die wie oben beschrieben eine Woche zuvor aus Knochenmarkszellen generiert wurden, wurden in IL2-Medium resuspendiert, so dass sich 2 x 10<sup>5</sup> Zellen in 250 µl befanden.



Die Zellen wurden nach dem Pipettierschema in Abb. 2.2 im Verhältnis 2 : 1 (T-Zellen zu DCs) in 48 Well-Platten ausgesät.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	4x10 <sup>5</sup> CD25+ 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25+ 2x10 <sup>5</sup> DCs
2	4x10 <sup>5</sup> CD25+ 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25+ 2x10 <sup>5</sup> DCs
3	4x10 <sup>5</sup> CD25+ 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs
4	4x10 <sup>5</sup> CD25+ 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs
5	4x10 <sup>5</sup> CD25+ 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25+ 2x10 <sup>5</sup> DCs
6	4x10 <sup>5</sup> CD25+ 2x10 <sup>5</sup> DCs	2x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> DCs + Medium	2x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs	4x10 <sup>5</sup> CD25- 2x10 <sup>5</sup> DCs

Abbildung 2.2 Beispiel für die Plattenbelegung der Kokultur in einer 48er Well-Platte

Zu Beginn der Versuchsreihe führten wir die Experimente mit zwei unterschiedlichen Zellzahlverhältnissen durch. Einmal wurden die 4 x 10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen wie oben beschrieben mit 2 x 10<sup>5</sup> DCs (2 : 1) in Kultur gebracht, parallel dazu wurden Kokulturen mit nur 1 x 10<sup>5</sup> DCs (4 : 1) durchgeführt. Die Versuche zeigten eine ausgeprägtere Suppression der Oberflächenexpression bei den Kokulturen mit 2 x 10<sup>5</sup> DCs, die mit dem Verhältnis 1 : 2 zu den T-Zellen standen. Daraufhin wurden alle folgenden Experimente im Verhältnis 1 : 2 von T-Zellen zu DCs durchgeführt.

Insgesamt wurde die Kokultur für drei Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die in der Abb. 2.2 hellgrau unterlegten Wells wurden für die letzten 24 Stunden mit 5 µl CpG (100 µg/ml) stimuliert. Die dunkelgrau unterlegten Wells wurden für die letzten 8 Stunden mit Golgi Plaque (1 µg/ml) versetzt, um die Sekretion produzierter Zytokine in den Überstand zu verhindern und die Zytokine für die anschließende intrazytoplasmatische FACS-Färbung intrazellulär anzureichern.

Den Wells, die mittelgrau unterlegt sind, wurde zu Beginn der Inkubationsperiode Anti-Interleukin-10-Antikörper zugesetzt. Die Konzentration betrug bei den ersten Experimenten 10 µg/ml, wobei die Konzentration bei den späteren Experimenten auf 20 µg/ml gesteigert wurde. Diese Wells wurden ebenfalls für die letzten 24 h mit CpG stimuliert.

Am dritten Tag wurde die Kokultur beendet und die in Tab. 2.4 und 2.5 dargestellten FACS-Färbungen durchgeführt.

*Tabelle 2.4 Übersicht der Oberflächen-FACS-Färbung der Kokultur; Kontroll-Färbungen nur von DCs unstimuliert oder CpG stimuliert und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen & DCs unstimuliert*

	FITC	PE
ko 1	ratIgG2a	hamIgG1
ko 2	MHC II	hamIgG1
1	ratIgG2a	CD11c
2	MHC II	CD11c
3	CD40	CD11c
4	CD80	CD11c
5	CD86	CD11c
ko 3 für CD86	hamIgG1	hamIgG1

*Tabelle 2.5 Übersicht der intrazellulären FACS-Färbungen der Kokultur („\*“ bedeutet intrazelluläre Markierung)*

	FITC	PE
1	hamIgG1	ratIgG*
2	CD11c	IL-12*
3	ko*	ratIgG bzw. CD25
4	IL-10*	CD25

### 2.2.7 Auswertung mithilfe des Durchflusszytometers

Das Durchflusszytometer wurde dazu verwendet, die Zellen zum einen hinsichtlich ihrer Größe und Granularität zu beurteilen und zum anderen, um gezielt markierte Rezeptoren auf ihrer Oberfläche nachzuweisen.

Elektronen des Lasermediums – im Falle des EPIXS®XL-MPC-Lasers Argon - werden dabei dazu angeregt, ihre ursprüngliche Elektronenschale zu verlassen und werden durch Energie in die nächst höhere Schale gebracht. Wenn diese Elektronen wieder in ihre Ausgangsschale zurückspringen, entsenden sie Strahlung einer charakteristischen Wellenlänge (488 nm). Auch andere Atome, die angeregt wurden, emittieren bei Auftreffen dieses Lichtes Strahlung derselben Wellenlänge. Das monochromatische Licht wird von Linsensystemen gebündelt und trifft dann auf die Zellen. Beim Auftreffen des Lichtes kommt es zu einer Streuung. Die Strahlen, die nach vorne (Forwardscatter) abgelenkt werden, geben Aufschluss über die Größe der Zelle, die gestreuten Strahlen, die orthograd zum Laserstrahl detektiert werden (Sidescatter), über die Zellgranularität (siehe Abb. 2.3).

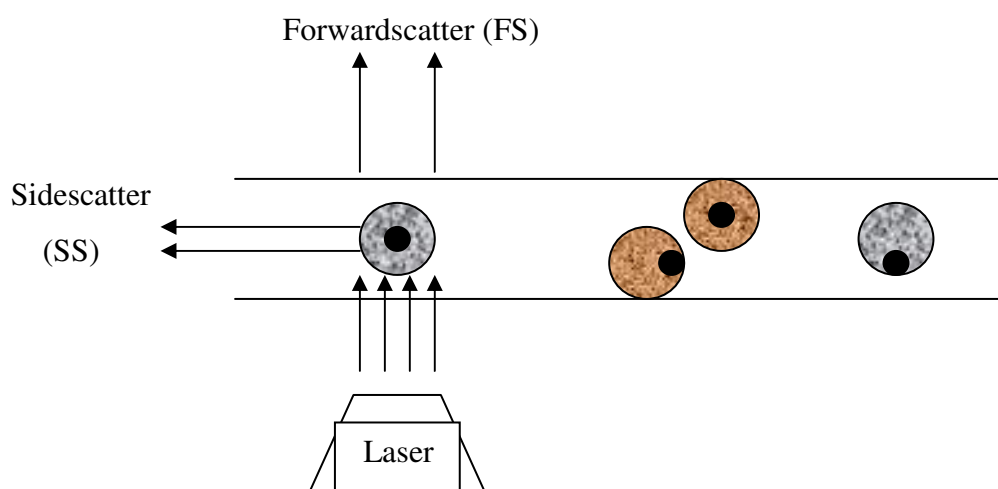


Abbildung 2.3 Schematischer Aufbau und Funktionsweise eines Durchflusszytometers

Dargestellt wird das Ergebnis in einem sogenannten „Dotplot“ (siehe Abb. 2.4), indem jeder Punkt einem gemessenen Event entspricht:

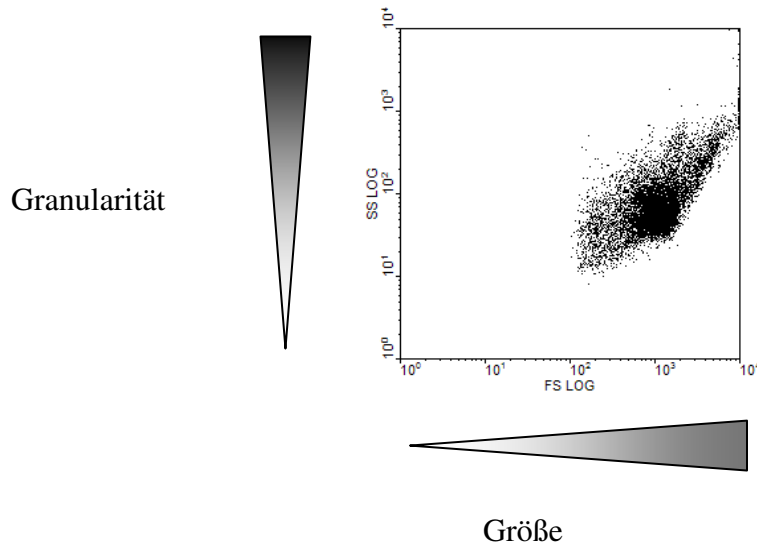


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung eines beliebigen Dotplots nach Größe und Granularität sortiert

Eine andere Möglichkeit der graphischen Darstellung sind so genannte Histogramme (s.u.).

Durch den Laserstrahl können aber auch Fluoreszenzfarbstoffe zum Emittieren eines für sie charakteristischen Wellenlängenbereichs angeregt werden. In den folgenden Versuchen wurde überwiegend mit FITC- und PE-Farbstoffen gearbeitet.

Über Spiegel und optische Systeme gelangte das nach Wellenlänge aufgeteilte Licht zu seinem jeweiligen Detektor. FITC wurde im Fluoreszenzkanal 1 (FL1), PE im Fluoreszenzkanal 2 (FL2) gemessen.

## 2.2.8 Vorbereitung der Zellen für die FACS-Messung

### 2.2.8.1 Oberflächenfärbungen

Pro Well wurden je  $0,2 \times 10^6$  Zellen auf einer 96er Rundbodenplatte verteilt. Nach einem 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 1600 rpm und  $4^\circ\text{C}$  wurden zu jedem Well 100  $\mu\text{l}$  des Fc-Blocks (1  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzugefügt. Der Anti-CD16/CD32-Fc-Block stellt einen monoklonalen Antikörper dar, der an die extrazelluläre Domäne der Fc $\gamma$ III- (CD16) und Fc $\gamma$ II (CD32)-Rezeptoren bindet. CD16 und/oder CD32 kommen u.a. auf allen NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und einigen aktivierten T-

Lymphozyten vor. Durch Blockierung der Fc-Rezeptoren wird eine unspezifische Bindung der FITC- und PE-markierten Antikörper, die sonst mit ihrem konstanten Fc-Teil an diese Fc-Rezeptoren binden könnten, inhibiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Wells mit 100 µl Färbepuffer aufgefüllt, die Platte 3 min lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Aufschütteln der Pellets wurden je 25 µl des FITC-markierten Antikörpers (Konz. 20 µg/ml) und 25 µl des PE-markierten Antikörpers (Konz. 20 µg/ml) hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 10 µg/ml der Antikörper zu erreichen. Die Antikörper inkubierten 30 - 40 min auf Eis. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass sich die Platte im Dunklen befand, da die Fluoreszenz-Farbstoffe lichtempfindlich sind. Nach Ablauf der Zeit schlossen sich zwei Waschschrte mit dem Färbepuffer an. Danach wurden die Zellen in 100 µl 2% PFA (Paraformaldehyd) pro Well fixiert. Bis zur Messung am FACS-Gerät konnten die fixierten Zellen bei 4°C gelagert werden.

#### **2.2.8.2 Intrazytoplasmatische Färbung (ICS)**

Um Aufschluss über die Zytokinsekretion der Zellen zu erlangen, wurden bei einem Teil der Zellen auch intrazytoplasmatische Färbungen durchgeführt.

Für die ICS wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Färbung – bei sehr geringen Zellzahlen auch weniger Zellen – eingesetzt. Der 1. Schritt bestand wie auch bei der einfachen Oberflächenfärbung aus einem Inkubationsschritt mit Fc-Block. Nach Zentrifugation erfolgte zunächst eine Einfachfärbung der Zelloberflächenantigene (in den meisten Fällen CD4). Hierzu wurden 25 µl des gewünschten Antikörpers verwendet (Konz 20 µg/ml), der mit 25 µl Färbepuffer verdünnt wurde, um ebenfalls eine Antikörper-Endkonzentration von 10 µg/ml zu erhalten. Nach 30 min Inkubation auf Eis schlossen sich zwei Waschschrte mit Färbepuffer an, um nicht gebundene farbstoffmarkierte Antikörper zu entfernen. Im folgenden Schritt wurde die Zellmembran mit Hilfe einer Cytofix/Cytoperm-Fertiglösung permeabilisiert. Hierzu wurden die Zellen in dieser Lösung resuspendiert und für 10 - 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend schlossen sich zwei Waschschrte mit der Perm/Wash-Lösung an. Erst danach erfolgte die eigentliche intrazytoplasmatische Färbung mit den ausgewählten Antikörpern (Endkonzentration 10 µg/ml) für 30 - 40 min im Dunkeln. Zwei abschließende Waschschrte trugen dazu bei, ungebundenen Farbstoff möglichst vollständig zu entfernen. Zur Messung wurden die Zellen in PBS (1x) aufgenommen.

Einige Zellen der durchgeführten Kokulturen wurden 8 - 10 h vor dem Ernten und ihrer Färbung mit Golgi Plaque (1 µg/ml) versetzt. Dies verhinderte die Exozytose der gebildeten Interleukine, indem der Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat unterbrochen wurde. So konnten auch schnell gebildete Zytokine, die bald nach ihrer Produktion sezerniert worden wären, nachgewiesen werden.

## 2.2.9 RNA

### 2.2.9.1 Isolierung der RNA

(Unter Verwendung des RNeasy® Mini Kits, der QIAshredder™ und des RNase free DNase Sets)

Am Tag der Zellisolierung wurden jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen in 350 µl RNeasy Lysepuffer (RLT), der mit 3,5 µl β-2-Mercaptoethanol versetzt wurde, gelöst. Der RLT-Puffer spaltet dabei die Disulfidbrücken, wodurch die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine aufgelockert wird. In diesem Zustand konnten die Proben für 1 - 2 Monate bei -80°C gelagert werden.

Die eigentliche RNA-Isolierung begann mit dem Schritt die 350 µl RLT-Puffer, in dem sich die Zellbestandteile befanden, in einen QIAshredder zu überführen. Der QIAshredder besitzt einen Filter, der erste grobe Verunreinigungen zurückhalten soll. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13000 Umdrehungen pro Minute (Biofuge fresco) konnten große Gewebstücke verworfen werden. Zur gereinigten Lösung wurden pro 350 µl jeweils 350 µl 70% Ethanol, der mit DEPC-Wasser hergestellt wurde, zugefügt und mit einer Pipette vermischt.

Für die folgenden Schritte wurde der RNase® Mini Kit verwendet. Die 700 µl wurden in die RNeasy® Mini Spin Columnnes überführt, die einen speziellen RNA-Filter enthielten, der die RNA zurückhielt. Die Spin Columnnes erhielten neue Auffangbehälter und wurden für 1 min bei 13000 Umdrehungen/min und 4°C zentrifugiert. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass der RNA-Filter nach der Zentrifugation vollständig trocken war. Die gewünschte RNA befand sich nun im Filter.

Im nächsten Schritt wurde die RNA noch mal mit 350 µl RT-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Als nächstes wurden 10 µl der DNase I aus dem Qiagen-Set sowie 70 µl RNase freier Puffer (RDD) pro Probe benötigt. Die DNase spaltete verunreinigende DNA, um eine möglichst reine RNA zu erhalten. Bei mehreren Proben

wurde ein größeres Volumen in einem Eppendorf-Cup angesetzt. Die Mischung wurde vermischt, durfte aber nicht gevortext werden.

Je 80 µl des Ansatzes wurden direkt auf die Mitte des Filters pipettiert und 30 min lang zur Inkubation bei RT stehen gelassen. Danach wurden die Spins für 15 sec bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert und das aufgefangene Volumen verworfen.

Es folgten zwei Waschschrte mit RPE-Puffer. Der Puffer wurde nach Anleitung aus 1 Volumenanteil RPE und 4 Volumenanteilen 96 - 100% Ethanol angesetzt. Jedes Spin Column wurde mit 500 µl gewaschen und im 1. Schritt für 1 min und im 2. Schritt für 3 min bei 13000 Umdrehungen zentrifugiert. Der aufgefangene Puffer wurde jeweils verworfen. Nun folgte das Eluieren der RNA. Dies wurde gekühlt auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde den Spin Columnes ein 1,5 ml Collection Gefäß aufgesetzt und 30 µl RNase freies H<sub>2</sub>O auf den Filter pipettiert. Das RNase freie Wasser war wichtig, damit die RNA, die isoliert werden sollte, nicht schon vorzeitig gespalten wurde. Nach der 1 minütigen Zentrifugation befand sich das Eluat mit der RNA im Eppendorf Cup. Das Eluat wurde erneut auf den Filter pipettiert und ein weiteres Mal zentrifugiert. Dies diente zur Verbesserung der Ausbeute.

### 2.2.9.2 RNA Quantifizierung

Quantifiziert wurde die RNA mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs RiboGreen™ unter Verwendung des RiboGreen® RNA Quantitation Kits.

Vorbereitend wurde der 20x TE-Puffer 1:20 mit DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Ebenso wurde RiboGreen™ 1:200 verdünnt. Pro RNA-Probe wurden 2 x 100 µl dieser Verdünnung benötigt.

Der Standard wurde 1:50 mit dem 1x TE-Puffer vorverdünnt, so dass die Vorverdünnung eine Konzentration von 2 µg/ml erreichte. Der Standard wurde im Dunkeln aufbewahrt.

Nach dem Schema in Tab. 2.6 wurden die Standard-Verdünnungsreihen angesetzt und jeweils 100 µl davon mit 100 µl RiboGreen versetzt.

Tabelle 2.6 Herstellen einer Verdünnungsreihe mit Standard und TE-Puffer

Standard (2 µg/ml)	100 µl	75 µl	50 µl	25 µl	10 µl	2 µl	-
+ TE	-	25 µl	50 µl	75 µl	90 µl	98 µl	100 µl
Endkonz.	1 µg/ml	750 ng/ml	500 ng/ml	250 ng/ml	100 ng/ml	20 ng/ml	0 µg/ml

Aus der in den 30 µl gelöste RNA wurde zum Teil eine 1:10 Verdünnung mit DEPC-Puffer hergestellt, z.B. 2 µl der RNA-Probe + 18 µl DEPC. Von dieser Lösung wurden 2 x 5µl auf eine schwarze 96-Well Platte pipettiert (in Doppelbestimmung) und mit jeweils 95 µl des 1x TE-Puffers auf 100 µl aufgefüllt. Auch die RNA-Proben wurden je mit 100 µl RiboGreen™ versehen.

An dieser Stelle konnte mit Hilfe des SPECTRAflour plus die Exstinktion bestimmt werden. Aus den beiden Werten der Doppelbestimmung wurde der Mittelwert berechnet, um die genaue Konzentration der RNA zu bestimmen.

### 2.2.9.3 ReverseTranskriptase-PCR

Unter Verwendung des PCR-Kits von Promega

Die optimale Konzentration zum Umschreiben von RNA in cDNA betrug 500 ng/ml.

Pro Probe wurden für die PCR folgende Materialien benötigt:

4 µl MgCl<sub>2</sub>

2 µl dNTP = PCR Nukleotide

1 µl dt Primer

2 µl 10x Puffer

0,75 µl Reverse Transkriptase

0,5 µl Inhibitor

Dieser MasterMix wurde vorsichtig gemischt und das Volumen von 10,25 µl mit RNA und RNase freiem H<sub>2</sub>O zu einem Gesamtvolumen von 20 µl ergänzt.

Nun folgten die eigentlichen Schritte der PCR:

#### β-Aktin-PCR

Die β-Aktin-Amplifikation wurde stets als Standard zur Kontrolle mitgeführt. Hierzu wurden jeweils 5 µl cDNA eingesetzt.

Die Primerhybridtemperatur betrug 60°C, die Elongation durch die Polymerase erfolgte bei 72°C in Anwesenheit von MgCl<sub>2</sub>.

#### Foxp3-PCR

Für die foxp3-PCR wurden neben 5 µl cDNA jeder Probe jeweils 2 µl des foxp3-Primer 1 mit der Sequenz 5'-CAG CTG CCT ACA GTG CCC CTA G-3' und 2 µl des foxp3-Primer 2 5'-CAT TTG CCA GCA GTG GGT AG-3' eingesetzt. Bei 60°C erfolgte die Primerhybridisierung. Die Elongation durch die Taq-Polymerase erfolgte bei 72°C in Anwesenheit von MgCl<sub>2</sub>.



Um die replizierten DNA-Abschnitte, sofern sie vorhanden waren, qualitativ darzustellen, wurde im Weiteren ein 2%iges Agarose-Gel gegossen. Dazu wurden für ein Gel mit 20 Kammern 150 ml TAE-Puffer (1x) mit 3,0 g Nabilere 3 : 1 Agarose-Pulver in einem Erlenmeier-Kolben gelöst. In einer Mikrowelle wurde diese Mischung aufgeköcht und so lange geschwenkt bis die Lösung klar wurde. Im nächsten Schritt wurden 9,0 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Ethidiumbromid diente als Farbstoff, um die Banden später sichtbar zu machen. Nun konnte das Gel gegossen werden und aushärten.

17 µl der replizierten DNA wurden jeweils 3 µl Färbepuffer zugefügt. Der 100 Basenpaar-Standard wurde 1:4 mit RNase freiem H<sub>2</sub>O vermischt, d.h. 5 µl 100 bp Standard und 12 µl H<sub>2</sub>O.

Die Kammern des 2%igen Agarose-Gels wurden mit je 18 µl Probe bzw. Standard befüllt. Zusätzlich lief eine Negativkontrolle – H<sub>2</sub>O und 3 µl Loading Dye – mit.

Bei einer Spannung von 90 V und einer Stromstärke von 400 mA dauerte die Auftrennung 45 min.

Anschließend konnte das Gel aus dem Gerät entnommen werden und die Auftrennungsbanden bei UV-Licht dargestellt und zur Dokumentation fotografiert werden.

### **2.2.10 CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>-Transfermodell in SCID-Mäusen**

Das Transfermodell, auf dessen Grundlage unsere Experimente durchgeführt wurden, wurde zuerst von Powrie beschrieben<sup>66</sup>. Aus der Beobachtung heraus, dass CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>-Zellen immunkompetenter Mäuse, die SCID-Tieren injiziert wurden, nach einigen Wochen eine Colitis auslösten, die der der CED beim Menschen ähnelte, wurde dieses Colitis-Modell entwickelt. Histologisch ist es durch eine massive Infiltration der Colonmukosa durch mononukleare Zellen, hohe Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen und klinisch durch ein sogenanntes Wasting-Syndrom (Verschlechterung des Allgemeinzustandes, Gewichtsverlust, Mangelerscheinungen) gekennzeichnet.

SCID-Mäuse besitzen kein funktionsfähiges zelluläres Immunsystem. Die transferierten Lymphozyten proliferieren in den lymphopenen Wirten und führen zu einer überschießenden Immunantwort von Effektor-T<sub>H</sub>1-Zellen.

Im Gegenzug wurde beschrieben, dass ein gleichzeitiger Transfer von  $CD4^+CD45RB^{high}$ - und  $CD4^+CD45RB^{low}$ -Zellen in immuninkompetente Mäuse eine Colitis verhindern kann <sup>67</sup>.

Um die aufwendige FACS-Analyse der  $CD4^+CD45RB^{high}$ -Zellen zu vermeiden, wendeten wir für unsere Experimente das weiterentwickelte Transfermodell mit  $CD4^+CD62L^+$ -Zellen, die in SCID-Mäusen ein ähnliches Verhalten zeigen und deren Transfer bei den Mäusen ebenfalls nach 6 - 8 Wochen zu einer Pancolitis führt, während ähnlich wie bei dem von Powrie entwickelten Colitismodell der Simultantransfer von  $CD4^+CD62L^+$ -Zellen zu einer abgeschwächten Colitis führt <sup>68</sup>.

Für die Isolierung von  $CD4^+CD62L^+$ -Zellen wurden die Milzen zweier gesunder Balb/c-Mäuse benötigt. Diese wurden mit dem Stempel einer Spritze zerkleinert und durch ein 70 µm Filter in ein 50 ml Falcon-Behältnis gegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension 15 min bei 1600 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Nach einem 2. Waschschrift wurde das Pellet in 5 ml Waschpuffer aufgenommen und pro  $10^7$  Zellen mit jeweils 5 µg der folgenden vier folgenden Antikörper versetzt: CD8a, CD11b, CD45rb, MHC II. Während einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C wurden die Antikörper an die CD4-negativen Zellen gebunden. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und pro  $10^7$  Zellen in 80 µl Waschpuffer resuspendiert. Pro  $10^7$  Zellen wurden dann 20 µl Goat-anti-rat MicroBeads hinzugegeben, die die an die CD4<sup>-</sup>-Zellen gebundenen Antikörper markierten. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 4°C. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in 500 µl Waschpuffer je  $10^8$  Zellen resuspendiert. Nun schloss sich die eigentliche Separation mit dem AutoMacs Gerät an. Das verwendete Programm nannte sich „deplete\_s“ und führte eine Positivselektion durch. Die Anzahl der  $CD4^+$ -Zellen wurden mit Hilfe der Neumann Zählkammer bestimmt und für die folgenden Berechnungen verwendet. Nach einem Zentrifugationsschrift wurde pro  $10^7$  Zellen 90 µl Waschpuffer und 10 µl der CD62- L-selectin MicroBeads Mouse zugefügt und die Suspension für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 500 µl Waschpuffer je  $10^8$  Zellen resuspendiert und mit dem Programm „possel\_s“, einer Positivselektion, separiert. Nun wurde die Anzahl der  $CD4^+CD62L^+$ -Zellen bestimmt und das zentrifugierte Pellet in so viel sterilem PBS gelöst, dass sich jeweils  $0,25 \times 10^6$  Zellen in 200 µl Volumen befanden. Denn jedes der Tiere sollte  $0,25 \times 10^6$  Zellen

intraperitoneal injiziert bekommen. Ein Teil der isolierten  $CD4^+CD62L^+$ -und  $CD4^+CD62L^-$ -Zellen wurde zur Kontrolle – wie in Tab. 2.7 beschrieben – gefärbt und mit dem FACS-Gerät analysiert.

Tabelle 2.7: FACS-Färbung der  $CD4^+CD62L^+$ -Zellen und der  $CD4^+CD62L^-$ -Zellen

	FITC	PE
1	ko	ko
2	CD4	ko
3	ko	CD45rb
4	CD4	CD45rb
5	CD4	CD62L
6	CD4	CD25
7	CD4	m290
8	Färbepuffer	-
9	Schaf-Anti-Ratte-AK	-

Jeweils 10-12 SCID-Mäuse wurden in individuell ventilierten Käfigen (IVC) gehalten, erhielten handelsübliches Futter und Aqua ad libitum.

In der Regel wurde die Colitis, die die Transfertierte entwickelten, nach 7 - 8 Wochen klinisch manifest. Um den richtigen Zeitpunkt abschätzen zu können, wurden die Tiere wöchentlich gewogen und ihr Kot auf Festigkeit beurteilt. Nach zunächst noch Zunahme der Tiergewichte ließen sich etwa 2 Wochen bevor die Colitis manifest wurde, Gewichtsabnahmen von 0,5 - 1 g pro Woche verzeichnen, wenige Tage vor Beendigung des Experiments wurde der Kot der Mäuse ungeformt und breiig, das Fell der Tiere struppiger und häufig entwickelten die Tiere ein Analekzem aufgrund der vermehrten Diarrhöe.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden von den entsprechenden Behörden genehmigt.gfgf

### 2.2.11 Luminex

Das Luminex-Verfahren ist eine Methode, die die Vorzüge von ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay) und die der Fluoreszenz-Immunassays verbindet, wodurch der Nachweis von Interleukinen in gewonnenen Überständen möglich und gleichzeitig

quantitativ messbar wird.

Zur Vorbereitung der Messung wurden Beadlyte® Maus Multi-Zytokine Flex Kits nach Protokoll B für Proben, die aus Zellkulturen stammen, verwendet.

Der Beadlyte® Maus 21-plex Multi-Zytokine Standard wurde in 1 ml Medium gelöst, für 15 sec gevortext und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Dies war nun Standard A. Um Standards B bis H zu erhalten, wurde eine Verdünnungsreihe (1:2), wie aus Tab. 2.8 ersichtlich, erstellt.

*Tabelle 2.8: Herstellung der Verdünnungsreihen für die Luminex-Standards*

Standard	µl des Standards	µl des Mediums	Konz. pg/ml
A	s.o.	0	5000
B	100 von A	100	2500
C	100 von B	100	1250
D	100 von C	100	625
E	100 von D	100	312,5
F	100 von E	100	156,25
G	100 von F	100	78,125
H	-	100	0

Die Filterplatte wurde mit 25 µl Beadlyte® Zytokin Assay Puffer benetzt, gevortext und das Vakuumgerät am Boden der Platte angebracht.

Danach wurden jeweils 50 µl vom Standard und je 25 µl der Proben in jedes Well pipettiert. Die gesamte Platte inkubierte dann 20 min auf einem Schüttler.

Vorbereitend wurden als nächstes die Beadlyte® Anti-Mouse Zytokin Beads für 15 sec gevortext und für weitere 15 sec in ein Sonication Bad (Ultraschallbad) gestellt.

Die Beads wurden dann zu 1x gelöst, indem 0,625 ml zu 12,5 - (0,625X Beadmates™) = X ml Beadlyte® Zytokin Assay Puffer zugegeben wurden. Von dieser Bead-Solution wurden jeweils 25 µl in die Wells pipettiert. Die Platte wurde mit Folie abgedeckt, kurz gevortext und über Nacht dunkel bei 4°C zur Inkubation aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurde ein Vakuum am Boden der Platte angelegt, um die Flüssigkeit zu entfernen. Den Wells wurde dann 50 µl des Assay Puffers zugefügt, die Platte gevortext und diese erneut mit dem Vakuum nach unten abgesaugt. Danach wurden 75 µl in die Wells pipettiert, die Platte mit einer Folie verschlossen und mit geringer Geschwindigkeit gevortext.

Für die folgenden Schritte musste nun die Beadlyte® Anti-Mouse Zytokin Biotin Lösung mit dem richtigen Verhältnis Beadlyte® Assay Puffer gemischt werden. Von dieser Lösung wurden jeweils 25 µl in die Wells pipettiert.

Die Platte wurde vorsichtig gevortext und 1½ h dunkel bei Raumtemperatur inkubiert.

Daran anschließend wurde die Beadlyte® Streptavidin-Phycoerythrin Lösung vorbereitet, in dem eine 1:25 Verdünnung mit dem Zytokine Assay Puffer hergestellt wurde.

Jedes Well erhielt 25 µl davon, wurde abgedeckt und gevortext. Daran schloss sich eine Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur an.

Zum Abstoppen der Reaktion, wurde danach jedem Well 25 µl Beadlyte® Stop Lösung zugefügt. Nach der Einwirkzeit von 5 min wurde die Vakuumpumpe angeschlossen, um die Platte trocken zu saugen. Vor der Messung wurde den Proben jeweils 125 µl Beadlyte® Zytokine Assay Puffer zugefügt und nach Vortexen sowie 1 min Schütteln konnte die Bestimmung der Zytokine am Luminex®100™ erfolgen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Isolierung der untersuchten Zellen

##### 3.1.1 Isolierung von Milzzellen gesunder und kranker Tiere

Aus der Milz einer gesunden Balb/c-Maus ließen sich in der Regel  $40 \times 10^6$  Gesamtzellen isolieren. 40 - 50% dieser Zellen waren T-Lymphozyten (s. Abb. 3.1), von denen ca. 30 - 40%  $CD4^+$ -T-Zellen (s. Abb. 3.2) zugeordnet werden konnten. 5 - 7% der gatedeten T-Zellen exprimierten zusätzlich das CD25-Oberflächenantigen und waren damit positiv für CD4 und CD25 (rechter oberer Quadrant Abb. 3.2).

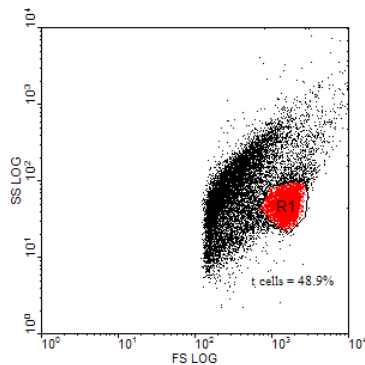


Abbildung 3.1 Gesamtmilzzellen von gesunden Tieren im Forward und Side-Scatter, Gate liegt auf Lymphozyten

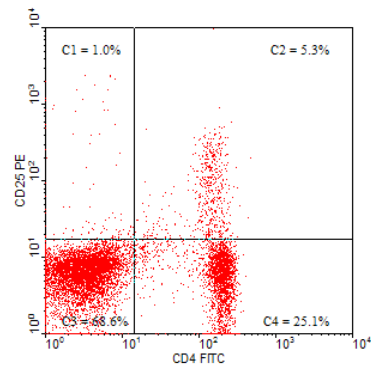


Abbildung 3.2 T-Lymphozyten von gesunden Tieren im CD4-FITC und CD25-PE markiert

Auch aus der Milz von Tieren, die durch den Transfer von  $CD4^+CD62L^+$ -Lymphozyten eine Colitis entwickelt hatten, ließen sich durchschnittlich  $40 \times 10^6$  Gesamtzellen isolieren. Von den Gesamtzellen waren allerdings nur 11,2% T-Zellen (s. Abb. 3.3) und lediglich 2 - 4% der gatedeten T-Lymphozyten zeigten Positivität für CD4 und CD25 (s. Abb. 3.4).

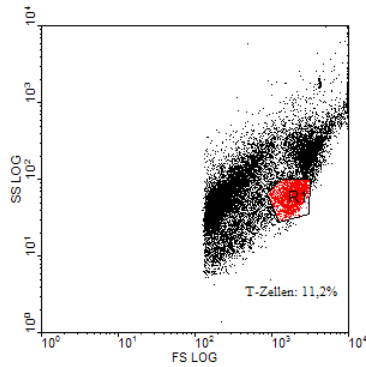


Abbildung 3.3 Gesamtmilzzellen von erkrankten Tieren im Forward und Side-Scatter

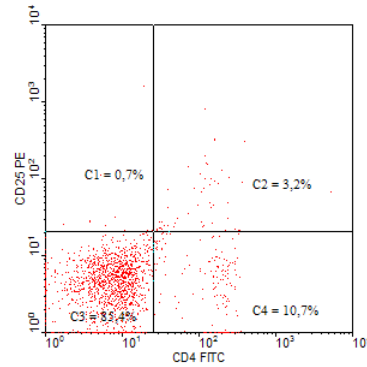


Abbildung 3.4 T-Lymphozyten von gesunden Tieren im CD4-FITC und CD25-PE markiert

### 3.1.2 Isolierung von mesenterialen Lymphknotenzellen gesunder und kranker Tiere

Aus den mesenterialen Lymphknoten einer gesunden Maus wurden zwischen  $50$  und  $60 \times 10^6$  Zellen gewonnen. Den größten Anteil der Gesamtzellen machten T-Lymphozyten mit ca. 68% aus (s. Abb. 3.5). Von den gateden T-Zellen waren 52,5%  $CD4^+$ -positive Lymphozyten, unter denen sich wiederum 9,8%  $CD4^+CD25^+$ -Zellen befanden (s. Abb. 3.6).

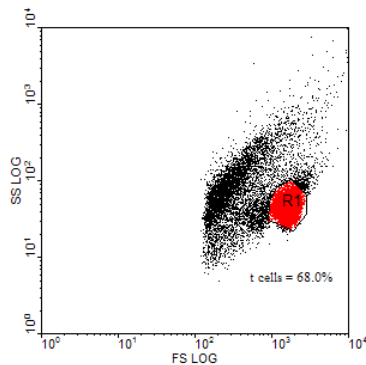


Abbildung 3.5 Gesamtzellen aus mesenterialen Lymphknoten gesunder Tiere im Forward und Side-Scatter, Gate liegt auf Lymphozyten

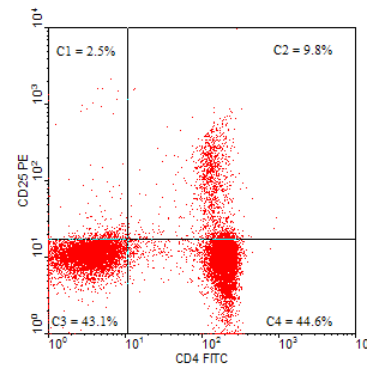


Abbildung 3.6 gatede mesenteriale Lymphozyten gesunder Tiere, CD4-FITC und CD25-PE markiert

Aus den mesenterialen Lymphknoten erkrankter Transfertierte ließen sich zwischen  $1,5$  und  $2,0 \times 10^6$  Zellen gewinnen, d.h. wesentlich weniger als aus mesenterialen Lymphknoten gesunder Zellen. Allerdings sollte bei diesen Vergleichen bedacht werden, dass SCID-Tiere vor Injektion von T-Zellen makroskopisch kaum zu detektierende Lymphknoten besitzen, die annähernd keine Lymphozyten enthalten. Der

Anteil der T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten erkrankter Tiere war mit 13,4% (s. Abb. 3.7) geringer als bei den gesunden Tieren (s. Abb. 3.5). Jedoch waren 75,1% der Gesamtzellen CD4 positiv, von denen 11,4% als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen identifiziert werden konnten (s. Abb. 3.8). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen machen bei erkrankten Tieren also einen höheren Anteil an den Gesamtzellen aus.

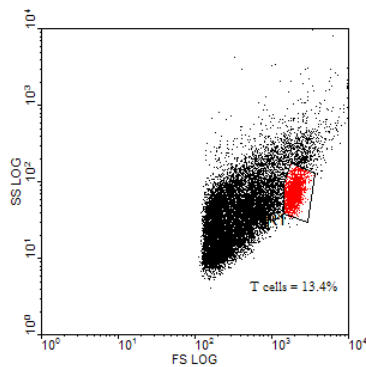


Abbildung 3.7 Gesamtzellen aus den mesenterialen Lymphknoten von Transfermäusen mit Colitis im Forward und Side-Scatter, Gate liegt auf Lymphozyten

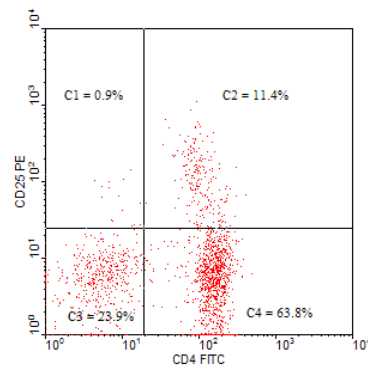


Abbildung 3.8 gatede mesenteriale Lymphozyten von Transfermäusen mit Colitis, CD4-FITC und CD25-PE markiert

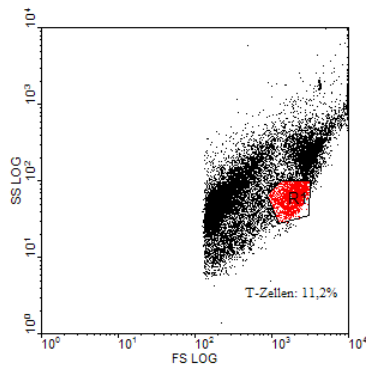


Abbildung 3.9 Gesamtmilzzellen von Transfermäusen mit Colitis im Forward und Side-Scatter, Gate liegt auf Lymphozyten

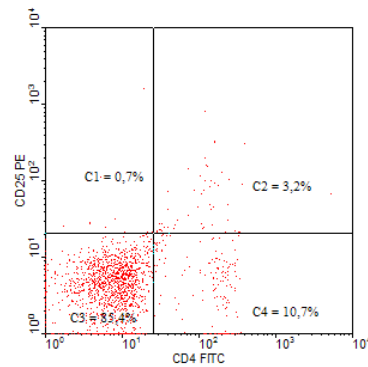


Abbildung 3.10 gatede Milz-Lymphozyten von Transfermäusen mit Colitis CD4<sup>+</sup>-FITC und CD25-PE markiert

### 3.1.3 Isolierung von Zellen aus der Lamina propria des Colons gesunder und kranker Tiere

Aus der Lamina propria des Colons einer gesunden Balb/c-Maus wurden im Schnitt  $10 \times 10^6$  Gesamtzellen gewonnen. Dabei waren etwa 40% der Gesamtzellen T-Zellen (s.



Abb. 3.9), die 30 - 35%  $CD4^+$ -Lymphozyten (s. Abb. 3.10) aufwiesen. Bei ca. 5% der gegateten T-Zellen zeigte sich eine Expression von CD25.

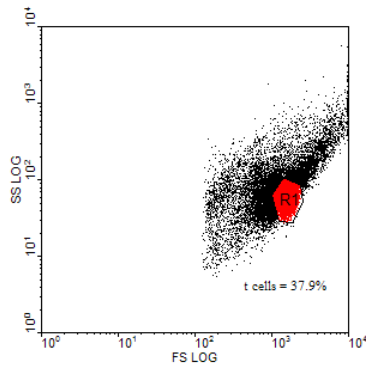


Abbildung 3.11 Gesamtzellen aus der Lamina propria gesunder Tiere im Forward und Side-Scatter, Gate liegt auf Lymphozyten

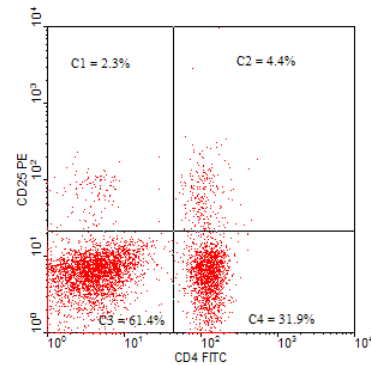


Abbildung 3.12 gegatete Lamina propria-Lymphozyten gesunder Tiere, CD4-FITC und CD25-PE markiert

Bei der Zell-Isolierung aus der Lamina propria des Colons erkrankter Transfer-Tiere konnten mit etwa  $11 - 12 \times 10^6$  Gesamtzellen pro Tier mehr Zellen als aus dem Darm gesunder Tiere isoliert werden. Unter den Gesamtzellen waren ca. 22 - 25% -T-Zellen (s. Abb. 3.13), von denen im Gegensatz zu den T-Lymphozyten aus der gesunden Colon-Mukosa mit 15,6% ein deutlich höherer Prozentsatz eine CD25-Expression zeigte (s. Abb. 3.14).

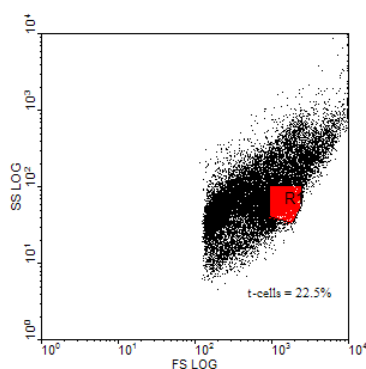


Abbildung 3.14 Gesamtzellen aus der Lamina propria von Transfer-mäusen mit Colitis im Forward und Side-Scatter

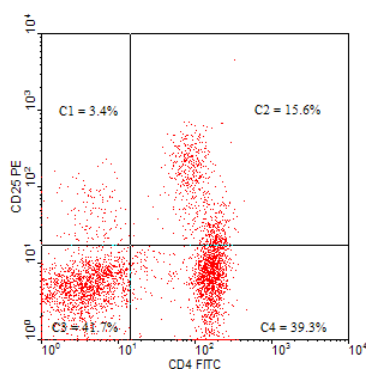


Abbildung 3.13 gegatete Lymphozyten aus der Lamina propria von Transfermäusen mit Colitis, CD4-FITC und CD25-PE markiert

Tabelle 3.1: Zusammenfassende Übersicht über die gemittelte Expression von CD4 und CD25 der jeweiligen Zellen in Prozent mit Angabe der Streuung in Klammern

	% CD4 der gegateten Lymphozyten (Streuung)	
isolierte Zellen aus:	gesunden Mäusen	Colitis-Mäusen
Milz	33,3 (29,1 - 41,3)	14,4 (13,9 - 14,8)
mLK	55,1 (53,1 - 57,1)	65,2 (40,0 - 75,8)
LP des Colons	27,7 (23,5 - 35,1)	41,1 (27,2 - 54,9)
	% CD4-CD25 der gegateten Lymphozyten (Streuung)	
isolierte Zellen aus:	gesunden Mäusen	Colitis-Mäusen
Milz	3,5 (2,6 - 4,8)	1,9 (0,5 - 3,2)
mLK	7,8 (5,8 - 9,8)	12,3 (5,9 - 19,5)
LP des Colons	2,0 (0,5 - 2,2)	10,0 (4,3 - 15,6)

## 3.2 Charakterisierung der isolierten Zellen

### 3.2.1 CD25 als ein Marker für regulatorische T-Zellen

#### 3.2.1.1 CD25 auf Milz-T-Lymphozyten

Die folgenden Abbildungen zeigen, dass bei der Isolierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus der Milz eine große Reinheit an CD25<sup>+</sup>-Zellen erzielt werden konnte. Bei den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen aus den Milzen gesunder Balb/c-Mäuse konnte durch Isolierung mittels magnetischer Beads eine Aufreinigung bis 94,4% und bei den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen aus Milzen erkrankter Tiere bis 86,1% erzielt werden (s. Abb. 3.15). Als Kontrolle wurde auch die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Population isoliert und im FACS analysiert. In dieser Zellpopulation fand sich mit max. 1,7% CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen bei gesunden und 0,6% CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen bei erkrankten Tieren immer noch ein „Restanteil“ CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten. Dies bedeutet, dass möglicherweise in der von uns verwendeten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Population immer noch ein sehr geringer Anteil von maximal 1,7% an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen enthalten war (oberer linker Quadrant).

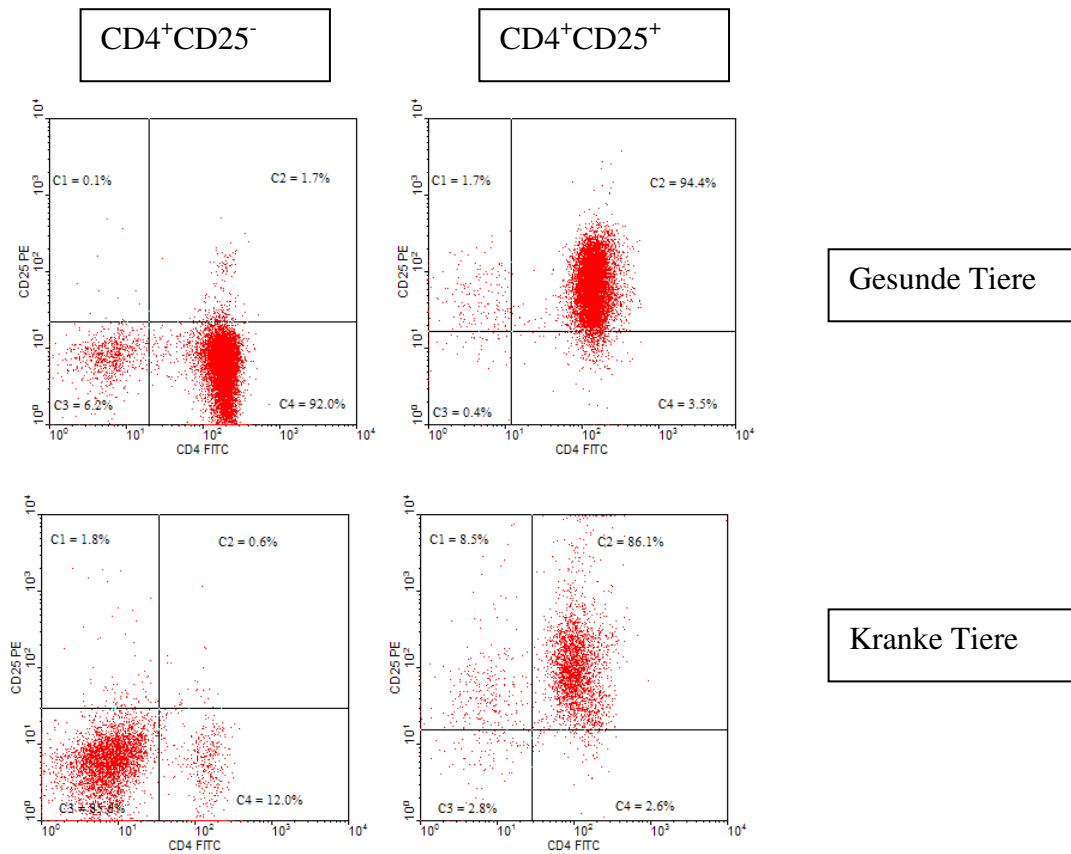


Abbildung 3.15 Charakterisierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Milzzellen, die aus gesunden und kranken Tieren isoliert wurden, hinsichtlich ihrer CD4- und CD25-Expression

### 3.2.1.2 CD25 auf mesenterialen Lymphknoten-T-Lymphozyten

Die Zellen der mesenterialen Lymphknoten ließen sich ähnlich gut aufreinigen wie die Milzzellen. Bei Zellen gesunder mLK konnte eine Reinheit der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen von 96,9% und bei Zellen, die aus Tieren mit Colitis isoliert wurden, von 84,1% erzielt werden (s. Abb. 3.16). Auch hier fand sich ein geringer Restanteil noch vorhandener CD25<sup>+</sup> Lymphozyten in den eigentlich CD25<sup>-</sup>-Zellpräparationen.

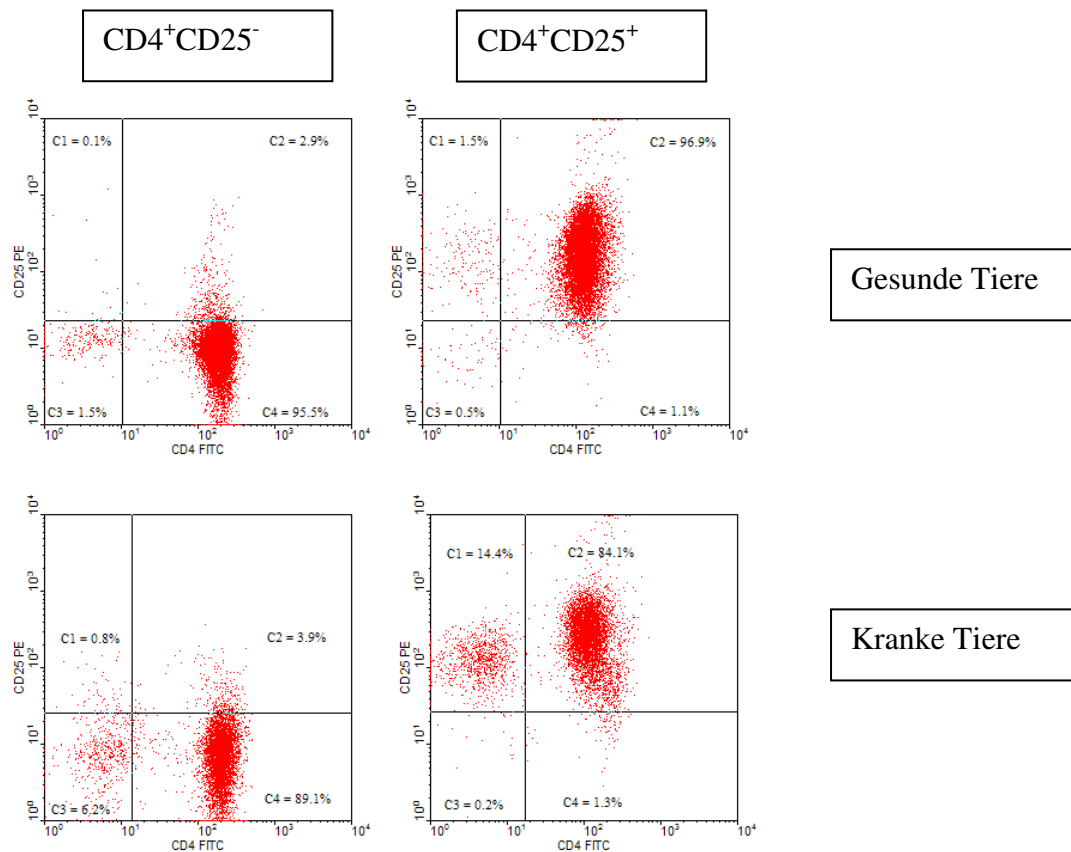


Abbildung 3.16 Charakterisierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen, die aus mesenterialen Lymphknoten gesunden und kranken Tiere isoliert wurden, hinsichtlich ihrer CD4- und CD25-Expression

### 3.2.1.3 CD25 auf Lamina propria-T-Lymphozyten

Wie Abb. 3.17 zeigt, befinden sich in der Lamina propria des Colons ähnlich wie in der Milz und mesenterialen Lymphknoten ebenfalls CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen, von denen angenommen wird, dass sie regulatorische Fähigkeiten besitzen. Die Isolierung und Aufreinigung der Lymphozytenpopulation aus der Colonmukosa ist deutlich schwieriger als die aus lymphatischen Geweben wie der Milz oder den mesenterialen Lymphknoten (mLK). Lediglich 59,2% der aufgereinigten Zellen aus der Lamina propria gesunder Tiere waren nach Aufreinigung tatsächlich CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen. Eine bessere Aufreinigung konnte aus der Colonmukosa von Tieren mit intestinaler Entzündung erreicht werden. Hier zeigten 85,3% der Zellen Expression für CD4 und CD25. Die isolierten Zellen konnten zwar hinsichtlich ihrer CD25-Expression gut isoliert werden, doch schien die CD4-Isolierung sowohl aus dem Colon gesunder als auch aus dem erkrankter Tiere nicht ausreichend sensitiv genug zu sein, um alle CD4-negativen Zellen auszusortieren. Problematisch war zudem, dass sich auch in der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Population des Colons mit max. 10% eine schwach CD25<sup>+</sup>-positive T-Zell-Population befand. Damit ist die Präparation dieser Zellpopulation aus der

Colonmukosa anspruchsvoll. Das Protokoll konnte leider trotz verschiedener Versuche nicht soweit optimiert werden, dass eine bessere Aufreinigung erreicht werden konnte.

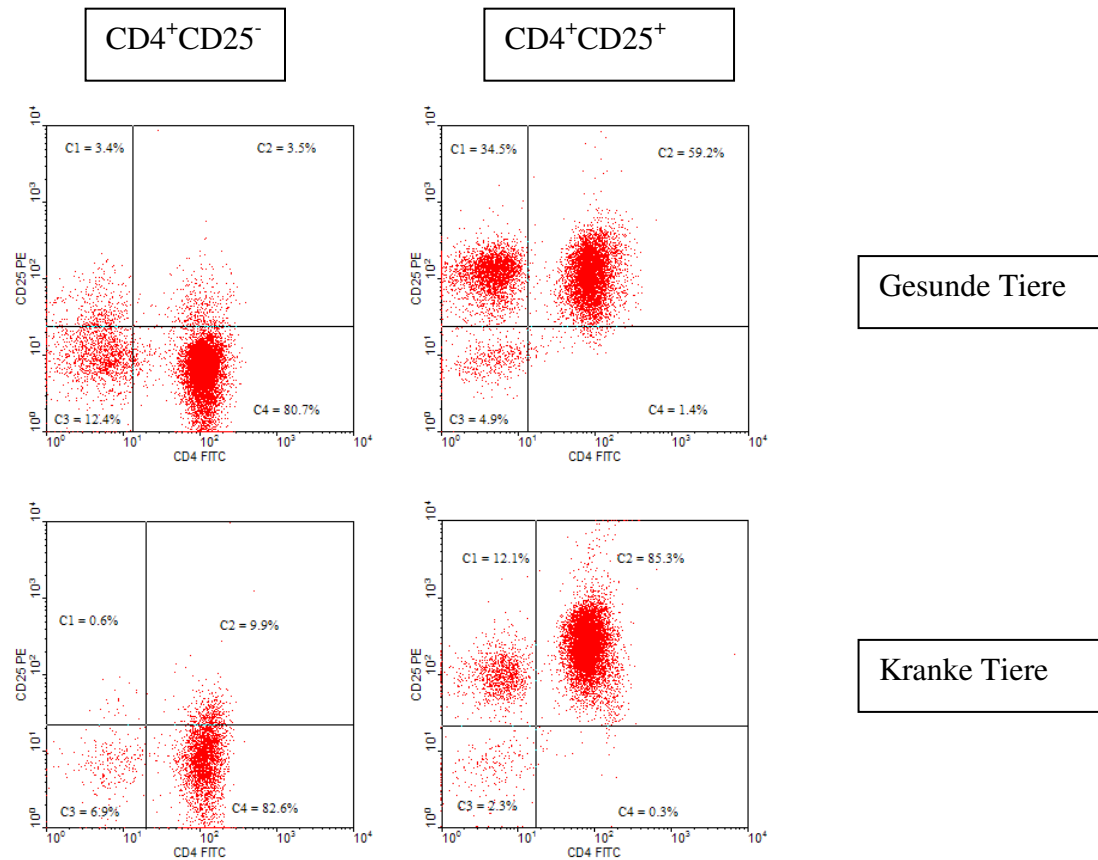


Abbildung 3.17 Charakterisierung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen, die aus Lamina propria gesunden und kranken Tiere isoliert wurden, hinsichtlich ihrer CD4- und CD25-Expression

Die Tabellen 3.2 und 3.3. zeigen die einzelnen CD25<sup>+</sup>-Expressionen in den durchgeführten Experimenten auf. Bei den Messwerten der gesunden Tiere ergibt sich ein homogenes Bild. Bei der CD25<sup>+</sup>-Expression der erkrankten Tiere in Tab. 3.3 fällt auf, dass sowohl bei den Gesamtzellen der mesenterialen Lymphknoten als auch bei den Zellen der Lamina propria ein größerer Anteil an CD25<sup>+</sup>-positiven Zellen zu finden ist.

Tabelle 3.2 Prozentsatz der CD25<sup>+</sup>exprimierenden Zellen gesunder Tiere in den verschiedenen Zellpräparationen der einzelnen Experimente

	CD25+ Expression in %				
	1. Exp	2. Exp.	3. Exp.	4. Exp.	Mittelwert
<b>isolierte Zellen aus</b>					
<b>Milz</b>					
<b>Gesamtzellen</b>	3,1	4,8	5,3	2,6	3,9

<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	1,2	4,5	3,0	1,7	2,6
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	91,3	96,0	95,6	94,4	94,3
<b>mLK</b>					
<b>Gesamtzellen</b>	n.u.	n.u.	9,8	5,8	7,8
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	n.u.	n.u.	2,9	2,2	2,6
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	n.u.	n.u.	96,9	95,6	96,3
<b>LpL</b>					
<b>Gesamtzellen</b>	n.u.	n.u.	4,8	4,4	4,6
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	n.u.	n.u.	3,5	2,9	3,2
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	n.u.	n.u.	59,2	60,0	59,6

Tabelle 3.3 Prozentsatz der CD25<sup>+</sup>exprimierenden Zellen erkrankter Tiere in den verschiedenen Zellpräparationen der einzelnen Experimente

	CD25+ Expression in %			
	1. Transfer	2. Transfer	3. Transfer	Mittelwert
<b>isolierte Zellen aus</b>				
<b>Milz</b>				
<b>Gesamtzellen</b>	3,2	0,5	0,8	1,5
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	3,7	0,6	1,8	2,0
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	88,8	86,1	61,5	78,8
<b>mLK</b>				
<b>Gesamtzellen</b>	19,5	11,4	5,9	12,3
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	3,9	3,6	3,4	3,6
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	66,4	86,1	78,6	77,0
<b>LpL</b>				
<b>Gesamtzellen</b>	15,5	4,3	4,1	8,0
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	2,9	4,0	5,5	4,1
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	85,3	86,9	58,5	76,9

### 3.2.2 Untersuchung des Vorkommens von $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf T-Lymphozyten

Neben dem Nachweis von CD25 auf den T-Lymphozyten konzentrierten wir uns auf einen weiteren oben beschriebenen Marker für regulatorische T-Zellen, das  $\alpha_E$ -Integrin. Dieses sollte ebenfalls – wie der IL-2-Rezeptor (CD25) – mittels FACS-Oberflächenfärbung detektiert werden. Hierzu wurde – wie im Abschnitt Materialien und Methoden beschrieben – der Anti- $\alpha_E$ -Integrin-Antikörper M290 eingesetzt.

#### 3.2.2.1 Expression des $\alpha_E\beta_7$ -Integrins auf Milz-T-Lymphozyten

Sowohl bei gesunden als auch bei aus der Milz an Colitis erkrankter Tiere isolierten  $CD4^+CD25^-$ -Lymphozyten wiesen lediglich 1,7% der Zellen das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf. Auf der Oberfläche von  $CD4^+CD25^+$ -Milzzellen gesunder Balb/c-Mäusen hingegen ließ sich das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin bei 18,6% der Zellen detektieren. Im Gegensatz hierzu zeigten sich 73,2% der  $CD4^+CD25^+$ -Milzzellen, die aus Tieren mit Colitis isoliert wurden  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin positiv (s. Abb. 3.18), was in drei weiteren Experimente bestätigt werden konnte (s. Tab. 3.4).

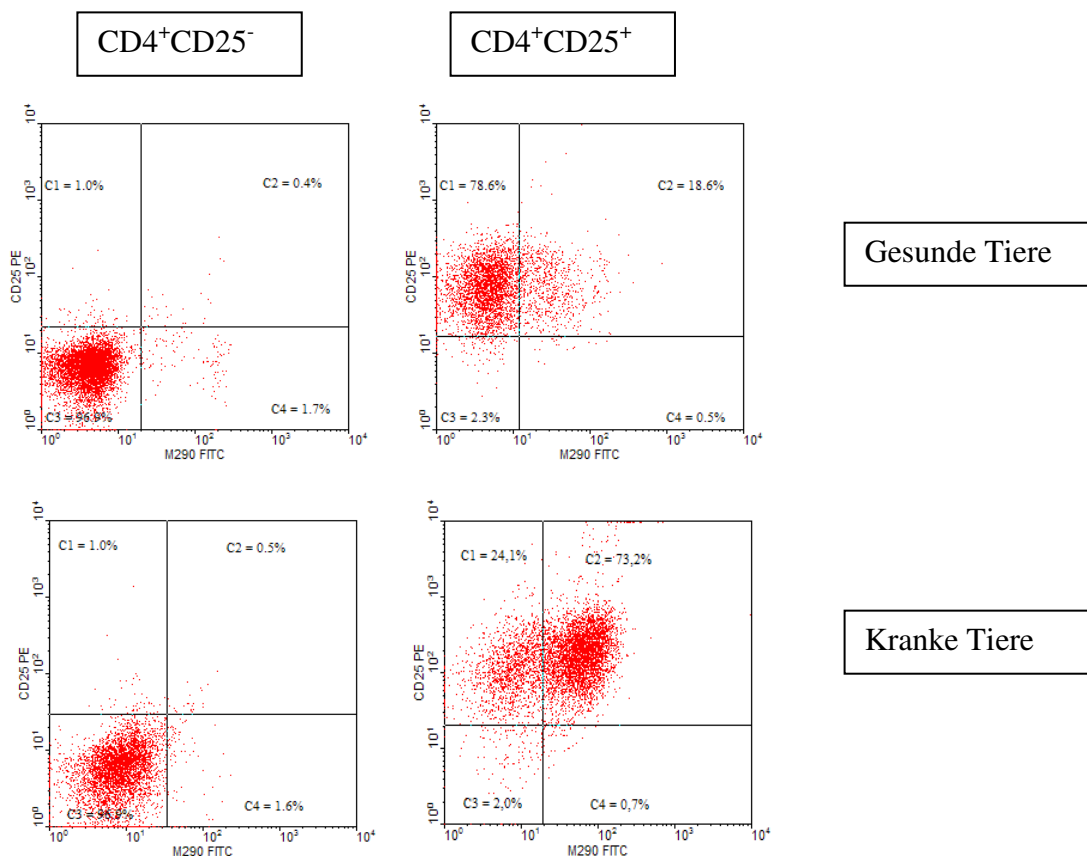


Abbildung 3.18 Übersicht des Vorkommens von  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf Milz-T-Lymphozyten anhand von FACS-Oberflächenfärbung

### 3.2.2.2 Expression des $\alpha_E\beta_7$ -Integrins auf mesenterialen Lymphknoten-T-Lymphozyten

Im Gegensatz zu den Zellen, die aus der Milz gesunder Mäuse gewonnen wurden, wiesen  $CD4^+CD25^+$ -mLK-Zellen mit 21,5% eine geringfügig größere Population an Zellen auf, die das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf der Oberfläche exprimierten (s. Abb. 3.19). Auch hier ließ sich nach Isolierung dieser Zellpopulation von Tieren mit Colitis eine deutlich größere Integrin- $\alpha_E$ -positive T-Zellpopulation detektieren. Hier zeigten 77,1% der  $CD4^+CD25^+$ -Lymphozyten aus mLK eine Expression für  $\alpha_E\beta_7$ . Überraschend ist die Beobachtung, dass diesmal im Gegensatz zu den bei gesunden Tieren analysierten Lymphozyten auch  $CD4^+CD25^-$ -mLK-Zellen von Mäusen mit intestinaler Entzündung zu einem hohen Prozentsatz (33,1%) dieses Integrin exprimierten. Dass es sich dabei nicht um einen einzelnen Messfehler handelte, überprüften wir mit zwei weiteren Transferversuchen (s. Tab. 3.5). Im Mittel exprimierten knapp die Hälfte (40,9%) der  $CD4^+CD25^-$ -Zellen  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin.

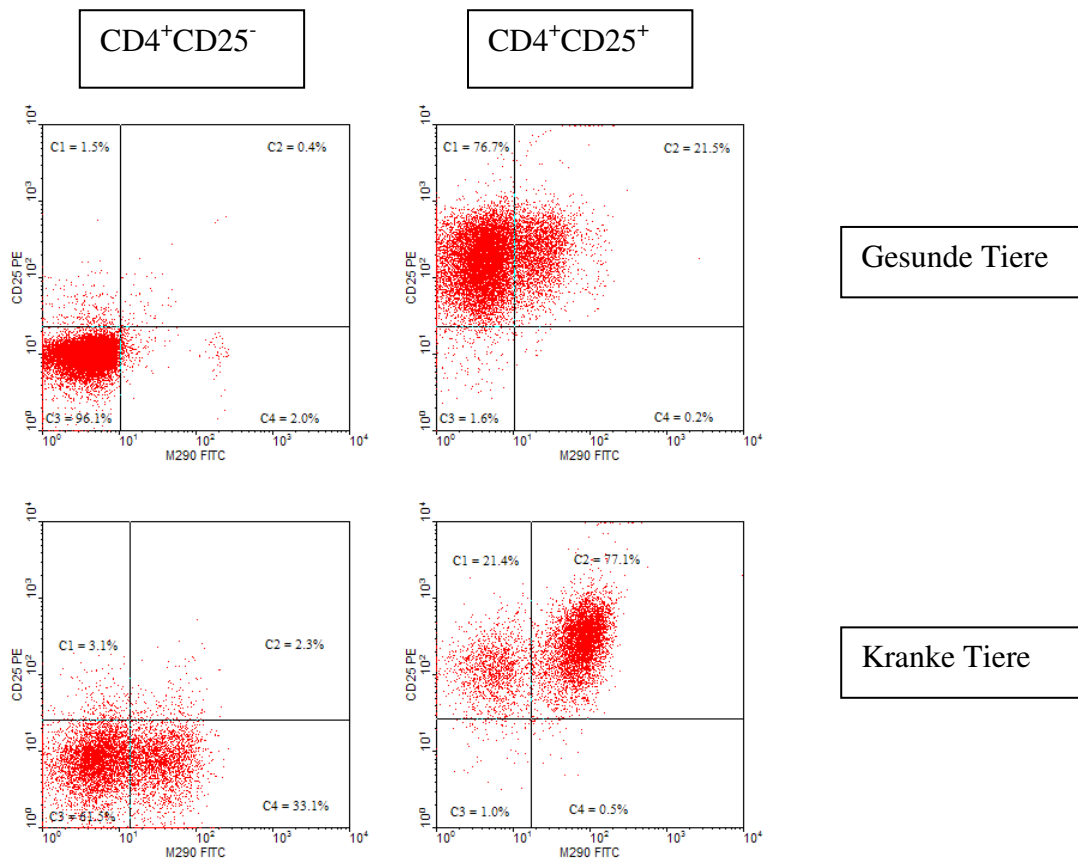


Abbildung 3.19 Übersicht über das Vorkommen von  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf mLK-T-Lymphozyten anhand von FACS-Oberflächenfärbungen



### 3.2.2.3 Expression des $\alpha_E\beta_7$ -Integrins auf Lamina propria-T-Lymphozyten

Mit 81,9% exprimierten annähernd alle  $CD4^+CD25^+$ -Zellen der Mukosa von Tieren mit Colitis das mukosale  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin, während lediglich 26% der  $CD4^+CD25^+$ -Lymphozyten aus gesunder Lamina propria das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin aufwiesen.

Interessanterweise ließ sich in einem Experiment auch hier wieder für  $CD4^+CD25^-$ -Zellen, die aus entzündlich veränderter intestinaler Lamina propria isoliert wurden, mit 31,7% eine starke Positivität für das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin aufzeigen. Dies gelang uns jedoch nur in einem von drei Experimenten (s. Tab. 3.5).

Somit ließ sich sowohl bei  $CD4^+CD25^-$ - als auch auf  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen, die aus mukosalen Geweben (mLK und intestinale Lamina propria) von Tieren mit Colitis isoliert wurden, eine deutliche Population  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin-positiver Lymphozyten nachweisen (s. Abb. 3.20).

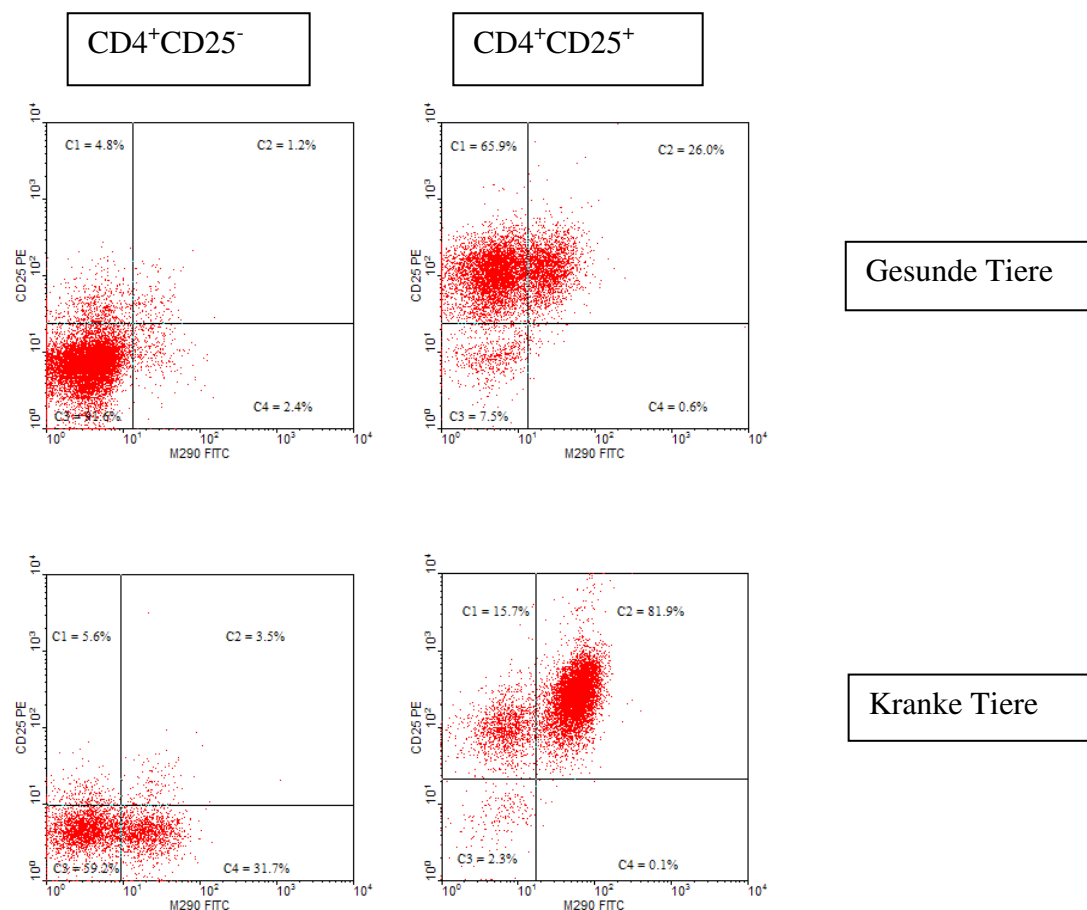


Abbildung 3.20 Übersicht über das Vorkommen von  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf Lamina propria-T-Lymphozyten anhand von FACS-Oberflächenfärbungen

Tabelle 3.4  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin-Expression (in Prozent) der untersuchten Zellen gesunder Tiere in den einzelnen Experimenten

	$\alpha_E\beta_7$ -Integrin-Expression in %					
	1. Exp	2. Exp.	3. Exp.	4. Exp.	5. Exp.	Mittelwert
<b>Isolierte Zellen aus</b>						
<b>Milz</b>						
<b>Gesamtzellen</b>	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	0,9	0,9
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	0,6	n.u.	4,7	1,6	1,7	2,2
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	10,5	n.u.	16,7	20,3	18,6	16,5
<b>mLK</b>						
<b>Gesamtzellen</b>	n.u.	n.u.	n.u.	7,1	5,5	6,3
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	n.u.	n.u.	n.u.	2,0	1,3	1,7
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	n.u.	n.u.	n.u.	21,5	21,7	21,6
<b>LpL</b>						
<b>Gesamtzellen</b>	n.u.	7,1	n.u.	4,1	1,3	4,2
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	n.u.	4,5	n.u.	6,1	2,6	4,4
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	n.u.	10,9	n.u.	26,0	n.u.	18,4

Tabelle 3.5  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin-Expression der untersuchten Zellen erkrankter Tiere in den einzelnen Experimenten

	$\alpha_E\beta_7$ -Integrin-Expression in %			
	1. Transfer	2. Transfer	3. Transfer	Mittelwert
<b>isolierte Zellen aus</b>				
<b>Milz</b>				
<b>Gesamtzellen</b>	n.u.	15,8	n.u.	15,8
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	8,2	1,6	3,7	4,5
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	73,2	n.u.	61,5	67,4
<b>mLK</b>				
<b>Gesamtzellen</b>	39,0	26,7	9,1	24,9
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	33,1	75,9	13,6	40,9
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	77,1	n.u.	78,6	77,9

LpL				
<b>Gesamtzellen</b>	25,0	12,6	n.u.	18,8
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	1,3	5,0	31,7	12,7
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	81,9	n.u.	n.u.	81,9

### 3.2.3 Foxp3

Wie bereits erwähnt, ist die Expression des IL-2-Rezeptors CD25 auch ein Marker für aktivierte Lymphozyten, der somit nicht in jedem Fall regulatorische T-Zellen definiert. Insbesondere in Entzündungsgebieten könnte daher die vermehrte Expression von CD25 auf T-Lymphozyten auch lediglich ein Zeichen für die Aktivierung dieser Zellen sein und sie daher nicht als regulatorisch charakterisieren.

In den letzten Jahren konnte wie oben bereits beschrieben gezeigt werden, dass zumindest eine Subpopulation regulatorischer T-Zellen durch die gleichzeitige Expression des  $\alpha_E\beta_7$ -Integrins (CD103) identifiziert werden kann. Mit dem Transkriptionsprotein foxp3 wurde zudem ein weiterer Marker für regulatorische Zellen beschrieben. Daher untersuchten wir in weiteren Versuchen die von uns isolierten CD25<sup>+</sup>-T-Zellen mittels PCR und FACS-Analyse auf das Vorhandensein von foxp3.

#### 3.2.3.1 Foxp3-PCR

Die aus den aufgereinigten Zellpopulationen isolierte RNA wurde für die Durchführung der PCR zunächst in cDNA umgeschrieben. Ein Teil der cDNA wurde für die  $\beta$ -Aktin-PCR verwendet.  $\beta$ -Aktin ist ein Strukturprotein, das in allen eukaryoten Zellen vorkommt und diente als Kontrolle sowohl für das Funktionieren der PCR als auch als Vergleich der eingesetzten cDNA-Mengen.

Die Auswertung der PCR zeigte Unterschiede in der foxp3-Expression: Bei den Gesamtzellen von Milz, mLK und Lp zeichneten sich jeweils keine oder allenfalls sehr schwach leuchtende Banden ab. Nach Auftrennung in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen konnte bei der qualitativen PCR der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen für den Transkriptionsfaktor foxp3 keine Bande nachgewiesen werden, während sich bei der PCR der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen deutlich das Produkt für foxp3 amplifizieren ließ. Die Banden für das House-keeping Gen  $\beta$ -Aktin waren dabei jeweils zwischen den beiden Zellpopulationen vergleichbar intensiv (s. Abb. 3.21).

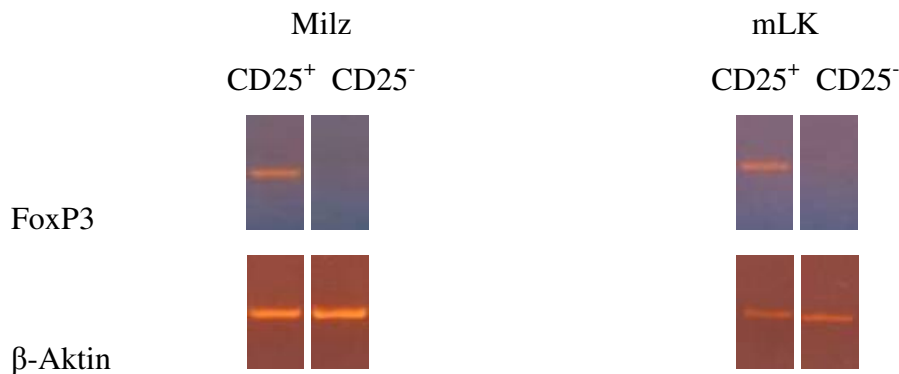
**Gesunde Balb/c**

Abbildung 3.21 Ausschnitte der Agarose-Gele nach Durchführung der PCR für *foxp3* und  $\beta$ -Aktin; Einsatz von cDNA von  $CD4^+CD25^+$ - und  $CD4^+CD25^-$ -Zellen, die aus der Milz und mLK gesunder Mäuse isoliert wurden.

Bei der Analyse der  $CD25^-$ -Zellen kranker Tiere zeigten sich ebenfalls keine Bande für *foxp3*. Leider war es aufgrund der z. T. sehr geringen Zellzahlen nicht möglich, eine PCR mit cDNA von  $CD4^+CD25^+$ -Zellen erkrankter Tiere durchzuführen.

Da das Vorhandensein von *foxp3* auch mit Hilfe einer intrazytoplasmatischen FACS-Färbung nachgewiesen werden kann, konzentrierten wir uns daher im Verlauf auf die Darstellung der Expression dieses Transkriptionsfaktors mittels FACS-Analyse.

### 3.2.3.2 Intrazellulärer Nachweis von *foxp3* in $CD4^+CD25^+$ - und $CD4^+CD25^-$ -Zellen

#### 3.2.3.2.1 *foxp3*-Nachweis in $CD4^+CD25^+$ - und $CD4^+CD25^-$ -Zellen aus der Milz

Bei  $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen aus der Milz gesunder und kranker Tiere ließ sich *foxp3* nicht in einer im Vergleich zu den Kontrollfärbungen größeren Zellpopulation identifizieren, womit die Ergebnisse der *foxp3* PCR in der Milz gesunder Tiere bestätigt wurde.

Die  $CD4^+CD25^+$ -Zellen der Milz hingegen zeigten sich mit 49,5% bei gesunden und 46,7% bei an einer Colitis erkrankten Tiere stark positiv für *foxp3* (s. Abb. 3.22). Auffallend ist, dass annähernd alle Zellen schwach positiv für *foxp3* zu sein scheinen. Dies zeigte sich in allen drei Transferversuchen mit an Colitis erkrankten Tieren und bei allen drei Auswertungen der *foxp3*-Messung bei gesunden Tieren.

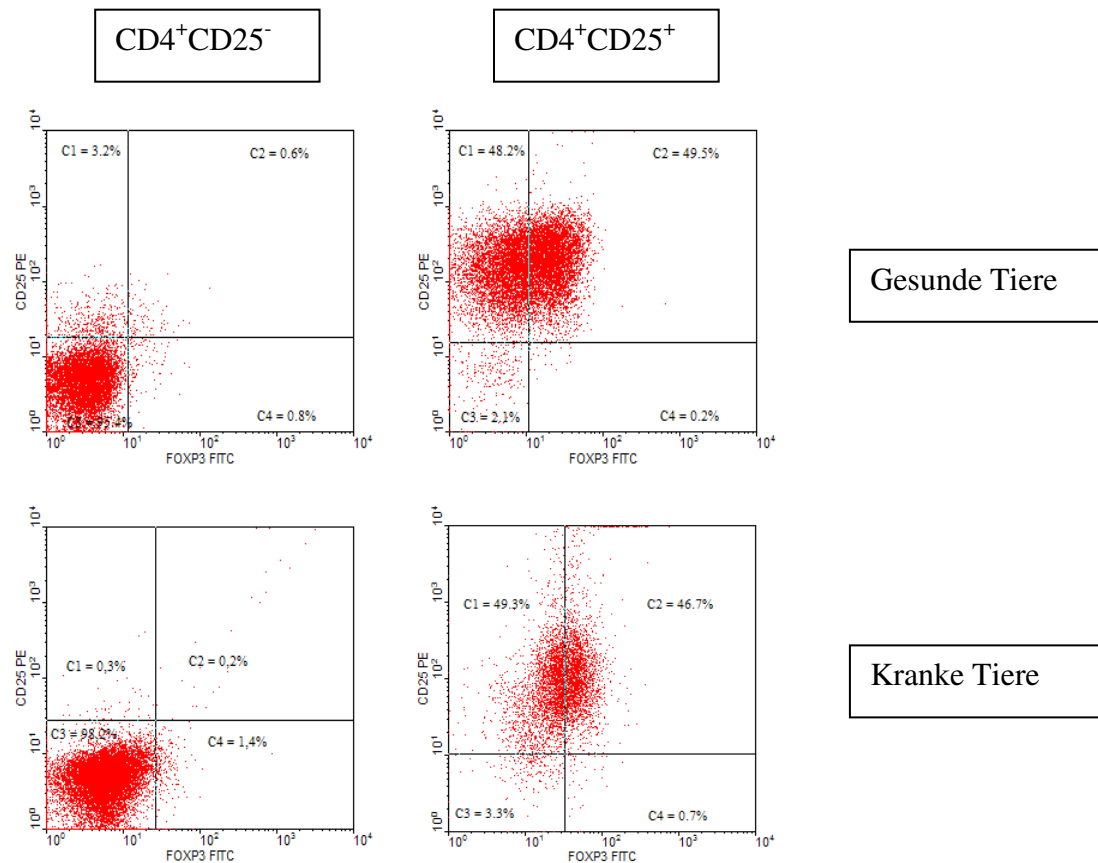


Abbildung 3.22 Übersicht über den *foxp3*-Nachweis bei  $CD4^+CD25^-$ - und  $CD4^+CD25^+$ -Milzzellen gesunder und kranker Tiere

### 3.2.3.2.2 *Foxp3*-Nachweis in $CD4^+CD25^-$ - und $CD4^+CD25^+$ -Zellen aus mesenterialen Lymphknoten

Für das Auftreten von *foxp3* bei mLK-Zellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei den Milzzellen:  $CD4^+CD25^-$ -Zellen, die aus gesunden mLK isoliert wurden, zeigten keine Expression von *foxp3*. Dies war auch der Fall für  $CD4^+CD25^-$ -Zellen, die aus mLK erkrankter Tiere aufgereinigt wurden.  $CD4^+CD25^+$ -Lymphozyten gesunder Tiere zeigten hingegen mit 44,6% zu einem hohen Prozentsatz eine Expressionen für *foxp3*. Dieser Prozentsatz lag mit 57% der  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen bei Lymphozyten, die aus mLK von Mäusen mit Colitis isoliert wurden, etwas höher. Bei der Betrachtung des Dotplots fällt auf, dass diese Population wahrscheinlich eine noch höhere *foxp3*-Expression aufweist, da durch das anhand von Kontrollen gesetzte Gate die schwach positiven Zellen für *foxp3* rein rechnerisch nicht zur positiven Population gezählt werden, obwohl sie insgesamt und im Vergleich zu den Negativkontrollen deutlich nach rechts verschoben sind und damit – wenn auch schwach – für *foxp3* positiv zu sein scheinen (s. Abb. 3.23).

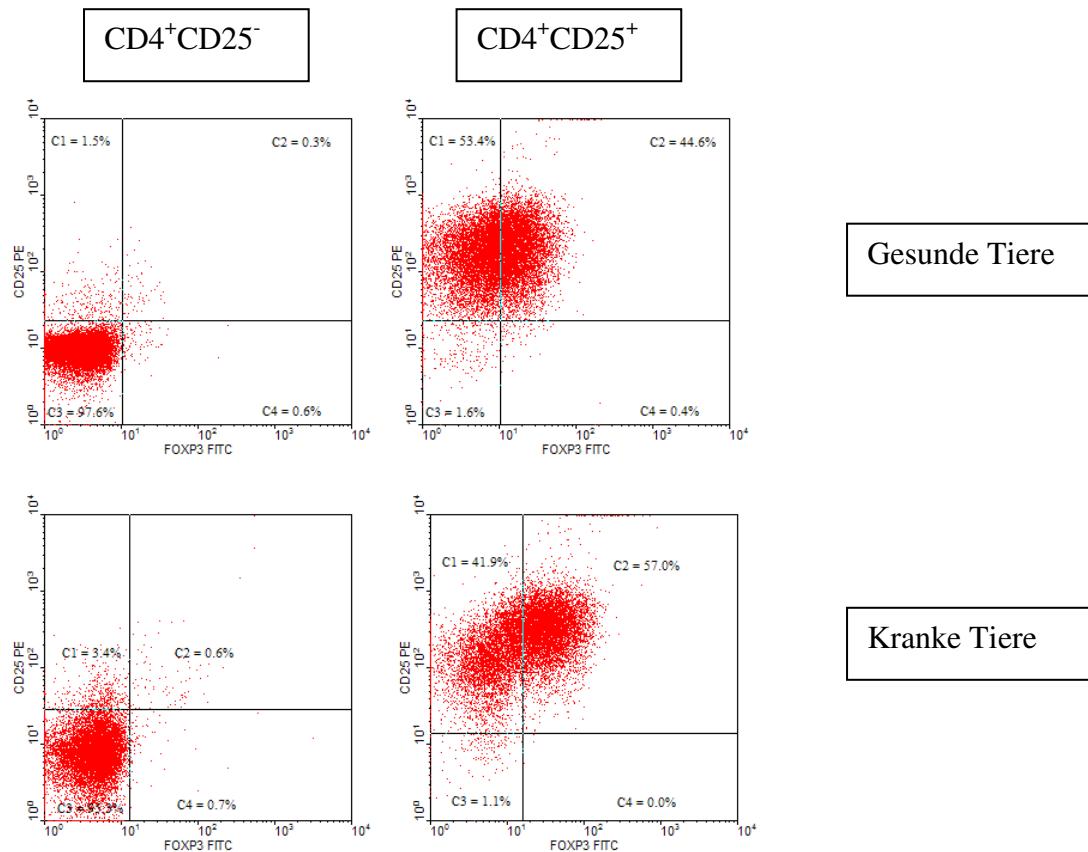


Abbildung 3.23 Übersicht über den foxp3-Nachweis bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-mLK-Zellen gesunder und kranker Tiere

### 3.2.3.2.3 Foxp3-Nachweis bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen aus der Lamina propria

Bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen der Lamina propria ließ sich intrazytoplasmatisch - sowohl bei den gesunden als auch bei den erkrankten Tieren – ebenfalls keine Expression von foxp3 detektieren. Demgegenüber gelang der Nachweis von foxp3 auf der Oberfläche der Lamina propria-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten. Dabei zeigte sich erneut ein deutlicher Unterschied zwischen den Zellen, die aus gesundem Colon und denen, die aus Tieren mit Colitis stammten. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen gesunder Kolonschleimhaut exprimierten zu 16,6% foxp3, während der Prozentsatz foxp3-positiver CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten aus entzündeter Lamina propria mit max. 52,1% deutlich höher lag (s. Abb. 3.24). Auch hier scheinen es – wie oben bei den mLK-Zellen beschrieben – wahrscheinlich mehr positive Zellen zu sein, wenn in Betracht gezogen wird, dass die Zellen eine homogene Population darstellen, die zwar durch das gesetzte Gate in stark positive und negative Zellen unterteilt werden, das Gate aber nicht den schwach positiven Zellen gerecht wird.

Wir führten die  $CD4^+CD25^+$ -Isolierung jeweils dreimal aus gesunden und dreimal aus erkrankten Tieren durch. Die foxp3-Expression der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen war bei den gesunden Tieren stets niedriger als bei den erkrankten. Jedoch fanden sich in weiteren Transfer-Experimenten bei Analysen der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen mit 12,6% und 11,0% positiver Zellen geringere Wert als in dem exemplarisch beschriebenen Experiment (s. Tab. 3.7).

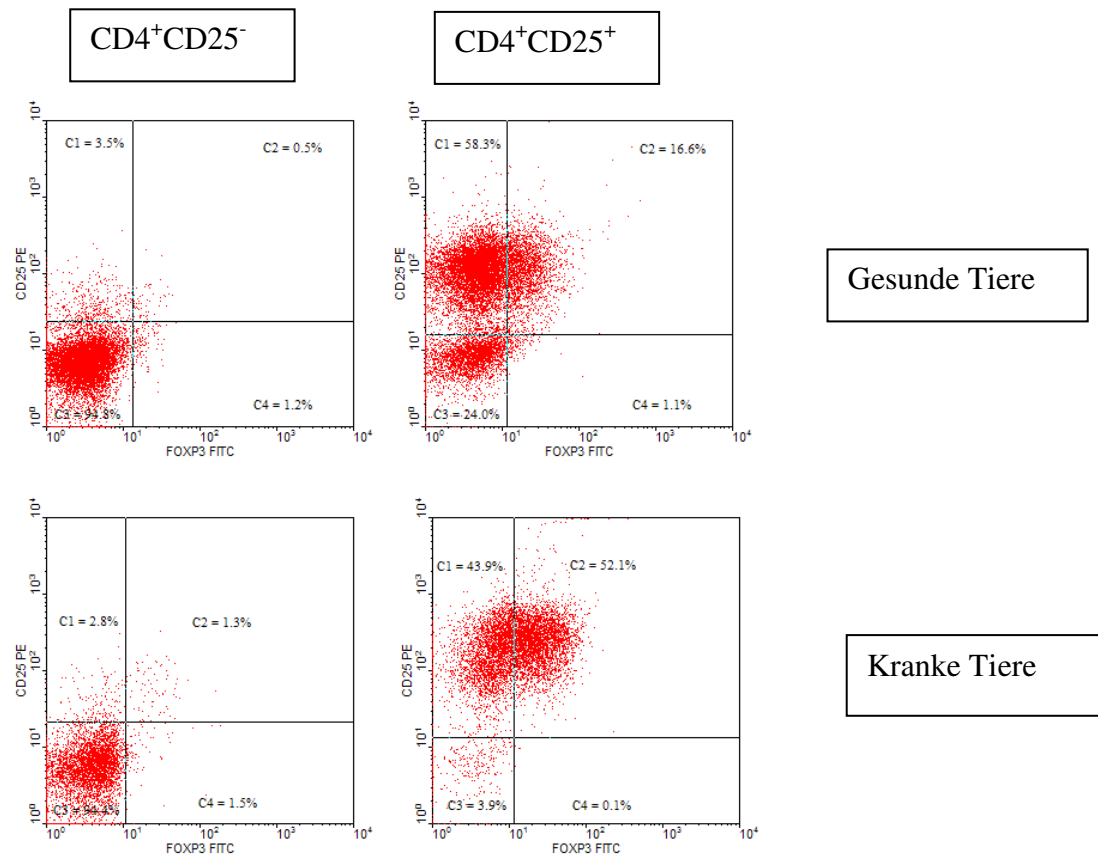


Abbildung 3.24 Übersicht über den foxp3-Nachweis bei  $CD4^+CD25^-$ - und  $CD4^+CD25^+$ -Lamina propria-Zellen gesunder und kranker Tiere

Tabelle 3.6: foxp3-Expression der untersuchten Zellen gesunder Tiere in den einzelnen Experimenten

	foxp3-Expression in %					
	1. Exp	2. Exp.	3. Exp.	4. Exp.	5. Exp.	Mittelwert
<b>isolierte Zellen aus</b>						
<b>Milz</b>						
<b>Gesamtzellen</b>	n.u.	n.u.	n.u.	2,0	1,2	1,6
<b><math>CD4^+CD25^-</math></b>	n.u.	n.u.	0,2	0,5	0,8	0,5
<b><math>CD4^+CD25^+</math></b>	n.u.	n.u.	59,5	26,8	49,5	45,3

<b>mLK</b>						
<b>Gesamtzellen</b>	n.u.	n.u.	n.u.	2,0	3,0	2,5
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	n.u.	n.u.	n.u.	0,6	0,4	0,5
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	n.u.	n.u.	n.u.	44,6	32,6	38,6
<b>LpL</b>						
<b>Gesamtzellen</b>	n.u.	n.u.	1,5	3,7	1,7	2,3
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	n.u.	n.u.	2,1	3,5	0,3	2,0
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	n.u.	n.u.	6,2	16,6	4,6	9,1

Tabelle 3.7 foxp3-Expression der untersuchten Zellen erkrankter Tiere in den einzelnen Experimenten

	foxp3-Expression in %			
	1. Transfer	2. Transfer	3. Transfer	Mittelwert
<b>isolierte Zellen aus</b>				
<b>Milz</b>				
<b>Gesamtzellen</b>	1,3	0,6	n.u.	1,0
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	1,4	2,0	1,7	1,7
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	54,4	46,7	26,2	42,4
<b>mLK</b>				
<b>Gesamtzellen</b>	13,4	6,3	n.u.	9,9
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	0,7	0,0	1,1	0,6
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	57,0	40,8	58,9	52,2
<b>LpL</b>				
<b>Gesamtzellen</b>	2,3	1,8	n.u.	2,1
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	1,5	2,3	1,1	1,6
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	52,1	11,0	12,6	25,2



### 3.2.4 Zytokinsekretion der charakterisierten regulatorischen T-Zellen

#### 3.2.4.1 Interleukin-10 Expression

Interleukin-10 (IL-10) ist ein Zytokin, das insbesondere von regulatorischen T-Zellen produziert wird und dem anti-inflammatorische Effekte zugesprochen werden. Um Aufschluss über die Funktion der von uns näher untersuchten  $CD4^+CD25^-$ - und  $CD4^+CD25^+$ -Zellen zu erlangen, führten wir Experimente durch, in denen die Zytokinproduktion dieser Zellen bestimmt wurde.

Nach 24-stündiger Inkubation der einzelnen Zellpopulationen unter Stimulation mit einem anti-CD3-Antikörper in Anwesenheit von Interleukin-2 (IL-2) wurde mit Hilfe einer Luminex-Messung die Sekretion von Interleukin-10 (IL-10) im Überstand bestimmt.

Tabelle 3.8 Übersicht der gemessenen Interleukin 10-Expressionen in den einzelnen Experimenten

<b>Interleukin 10-Expression</b>					
<b>Milzzellen gesunder Tiere</b>					
	1. Exp.	2. Exp.	3. Exp.	4. Exp.	5. Exp.
<b>GMZ</b>	76,35	128,83	90,31	n.u.	n.u.
<b><math>CD4^+CD25^-</math></b>	294,22	418,94	607,44	n.u.	n.u.
<b><math>CD4^+CD25^+</math></b>	142,37	205,65	625,55	n.u.	n.u.
<b>mLK-Zellen gesunder Tiere</b>					
	1. Exp.	2. Exp.	3. Exp.	4. Exp.	5. Exp.
<b>mLK</b>	n.u.	137,68	224,59	n.u.	n.u.
<b><math>CD4^+CD25^-</math></b>	n.u.	265,23	150,79	n.u.	n.u.
<b><math>CD4^+CD25^+</math></b>	n.u.	715,52	2011,7	n.u.	n.u.
<b>Lp-Zellen gesunder Tiere</b>					
	1. Exp.	2. Exp.	3. Exp.	4. Exp.	5. Exp.
<b>LpL</b>	n.u.	n.u.	83,29	164,75	158,5
<b><math>CD4^+CD25^-</math></b>	n.u.	n.u.	243,35	181,75	1449,5
<b><math>CD4^+CD25^+</math></b>	n.u.	n.u.	866,82	683,47	6306,1

<b>Milzzellen erkrankter Tiere</b>					
	1. Transfer	2. Transfer	3. Transfer	4. Transfer	
<b>GMZ</b>	41,11	117,21	310,57	228,69	
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	181,72	74,3	524,46	687,37	
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	63,39	19414,25	220,98	565,8	
<b>mLK erkrankter Tiere</b>					
	1. Transfer	2. Transfer	3. Transfer	4. Transfer	
<b>mLK</b>	582,7	116,07	491,01	515,75	
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	556,53	74,34	702,82	726,315	
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	1162,5	5151,2	811,88	2116,21	
<b>Lp-Zellen erkrankter Tiere</b>					
	1. Transfer	2. Transfer	3. Transfer	4. Transfer	
<b>LpL</b>	941,23	n.u.	932,87	1993,4	
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup></b>	175,23	n.u.	430,72	690,25	
<b>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup></b>	484,14	n.u.	618,25	445,5	

Die IL-10-Sekretion der Gesamtmilzzellen (GMZ) lag im Mittel bei 98,5 pg/ml. Aufgereinigte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der Milz produzierten etwa dreimal so viel. Bei zwei Experimenten konnte in den Überständen der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen geringfügig mehr IL-10 nachgewiesen werden. Bis auf einen Ausreißerwert von 19414,25 pg/ml bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen erkrankter Tiere sezernierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen im Vergleich zu CD25<sup>-</sup>-Lymphozyten mehr IL-10.

Gesamtzellen mesenterialer Lymphknoten gesunder Tiere produzierten mit 181,1 pg/ml etwa doppelt so viel IL-10 wie Gesamtmilzzellen. Bei den mesenterialen Lymphknotenzellen fand sich eine starke IL-10-Sekretion der gesunden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen (im Mittel 1363,61 pg/ml vs. 208,01 pg/ml bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen). Wurden Zellen erkrankter Tiere stimuliert, so zeigte sich dieser Effekt auch hier. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen waren sekretorisch am stärksten aktiv, wobei die gemessenen Konzentrationen zwischen den verschiedenen Experimenten stark schwankten (minimal 811,56 pg/ml und maximal 5151,2 pg/ml).

Bei Lamina propria Gesamtzellen zeigt sich ein großer Unterschied in der gemessenen IL-10-Sekretion. Während bei Lamina propria Gesamtzellen gesunder Tiere eine Sekretion zwischen 80 und 305 ng/ml nachgewiesen werden konnte, zeigten die Gesamtzellen erkrankter Tiere eine deutlich gesteigerte IL-10-Sekretion von 932,87 bis 1994,4 ng/ml. Die IL-10-Sekretion war bei den Gesamtzellen stärker als bei  $CD4^+CD25^-$ - und  $CD4^+CD25^+$ -Zellen erkrankter Tiere. Unter den Lamina propria Zellen gesunder Tiere waren die  $CD4^+CD25^+$ -Zellen sekretorisch am aktivsten, gefolgt von  $CD4^+CD25^-$ -Zellen, die im Mittel die Hälfte bis Dreiviertel weniger produzierten. Bei den  $CD4^+CD25^-$ - und den  $CD4^+CD25^+$ -Zellen fällt es schwer, eine Aussage zu treffen. In zwei der drei Experimente wiesen die  $CD4^+CD25^+$ -Zellen eine um 200 – 300 ng/ml höhere IL-10-Sekretion auf. Bei einem Experimente wurde im Überstand der  $CD4^+CD25^-$ -Zellen mit 690,25 ng/ml mehr IL-10 als bei den  $CD4^+CD25^+$ -Zellen bestimmt.

Exemplarisch an einem der oben aufgeführten Experimente bedeutete dies:

Im Gegensatz zu den Zellen aus Milz und Lamina propria konnten bei den  $CD4^+CD25^+$ -Zellen der mesenterialen Lymphknoten (mLK) deutlich höhere Konzentrationen an IL-10 gemessen werden. Bei  $CD4^+CD25^+$ -mLK-Zellen gesunder Tiere konnten IL-10-Konzentrationen von bis zu 2011,1 pg/ml registriert werden. Dahinter fielen die mLK-Gesamtzellen mit im Mittel 224,6 pg/ml und die  $CD4^+CD25^-$ -Zellen aus gesunden mLK mit 150,8 pg IL-10/ml deutlich zurück.

$CD4^+CD25^+$ -Zellen aus mLK erkrankter Tiere zeigten ebenso wie die  $CD4^+CD25^+$ -Zellen gesunder Tiere hohe Konzentrationen an IL-10 nach 24stündiger Stimulation (im Mittel 2116,2 pg/ml). Die IL-10-Sekretion der  $CD4^+CD25^-$ -Zellen lag mit einer mittleren Konz. von 628,2 pg/ml deutlich darunter. Am wenigsten IL-10 produzierten die Gesamt-mLK-Zellen mit im Mittel 450,9 pg/ml.

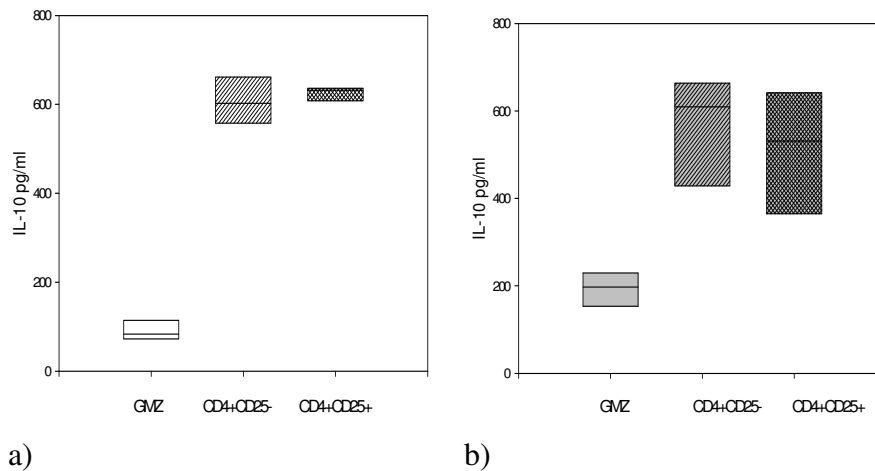


Abbildung 3.25 Als Boxplot veranschaulichte IL-10 Sekretion von GMZ, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der Milz a) gesunder Tiere b) erkrankter Tiere nach 24stündiger Stimulation mit anti-CD3 und IL-2

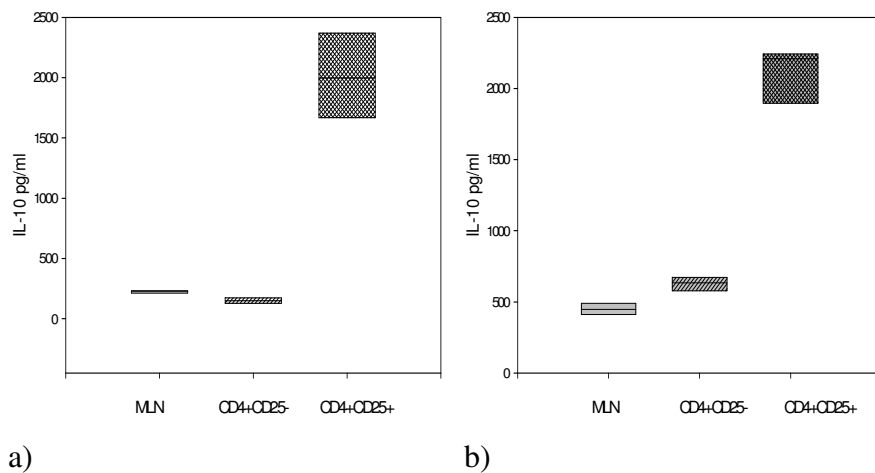


Abbildung 3.26 Als Boxplot veranschaulichte IL-10 Sekretion von Gesamtzellen, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der MLK a) gesunder Tiere b) erkrankter Tiere nach 24stündiger Stimulation mit anti-CD3 und IL-2

Die Gesamtzellen der Lamina propria gesunder Mäuse produzierten im Mittel 164,8 mg/dl, gesunde CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen mit durchschnittlich 181,2 mg/dl etwas mehr und die gesunden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen lagen bei 683,5 mg/dl deutlich höher. Die Variationsbreite wird durch die in Abb. 3.25 abgebildeten Box Plots verdeutlicht.

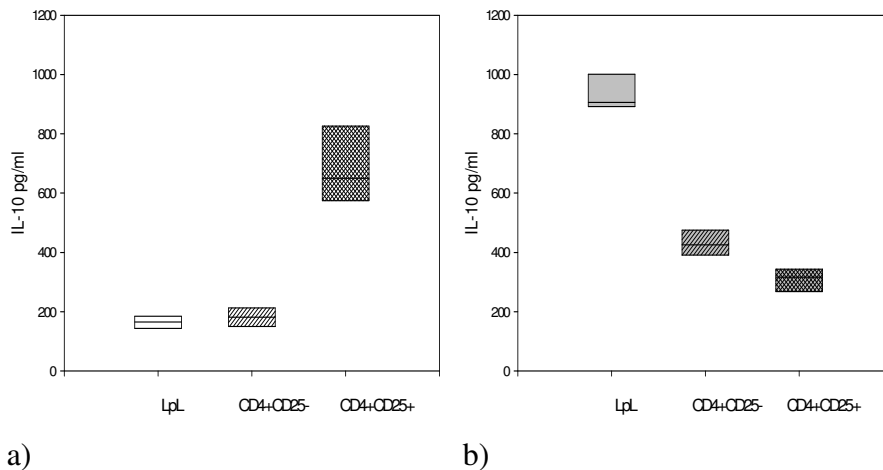


Abbildung 3.27 Als Boxplot veranschaulichte IL-10 Sekretion von Gesamtzellen,  $CD4^+CD25^-$  und  $CD4^+CD25^+$ -Zellen der Lamina propria a) gesunder Tiere b) erkrankter Tiere nach 24stündiger Stimulation mit anti-CD3 und IL-2

In den Überständen der Lamina propria Zellen erkrankter Tiere konnte bei den Gesamtzellen eine höhere IL-10-Konzentration gemessen werden (durchschnittlich 932,9 mg/dl). Nach Stimulation von  $CD4^+CD25^-$ -Zellen wurde in ihren Überständen im Mittel ein Wert von 430,7 mg/dl gemessen. Am wenigsten IL-10 wurde in den Überständen der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen erkrankter SCID-Mäuse detektiert (309,1 mg/dl).

### 3.3 Ergebnisse der Kokultur der T-Zell-Subpopulationen mit DCs

Nachdem wir die von uns isolierten  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen phänotypisch und funktionell untersucht hatten, führten wir im nächsten Schritt weitere Versuche durch, um die Hypothese, dass  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen die Funktion dendritischer Zellen beeinflussen können, zu untersuchen. Wir wollten dabei untersuchen, ob regulatorische T-Zellen durch direkte Interaktion mit dendritischen Zellen in der Lage sind, diese zu funktionell „tolerogenen“ dendritischen Zellen zu modulieren und dadurch ihre Aktivierbarkeit zu inhibieren. Hierzu wurden Kokulturen untersucht, wobei jeweils  $4 \times 10^5$  T-Zellen mit  $2 \times 10^5$  in vitro aus dem Knochenmark gesunder Mäuse generierten DCs inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten DCs, die ohne die Anwesenheit von Lymphozyten inkubiert und stimuliert wurden. Um beobachten zu können, ob die Kokultur mit den verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen einen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der dendritischen Zellen hat wurde – um eine bakterielle Stimulation nachzuahmen –

einem Teil der Kulturbedingungen der Kokultur für die letzten Stunden CpG, ein Fragment bakterieller DNA, welches in der Lage ist dendritische Zellen zu stimulieren hinzugefügt.

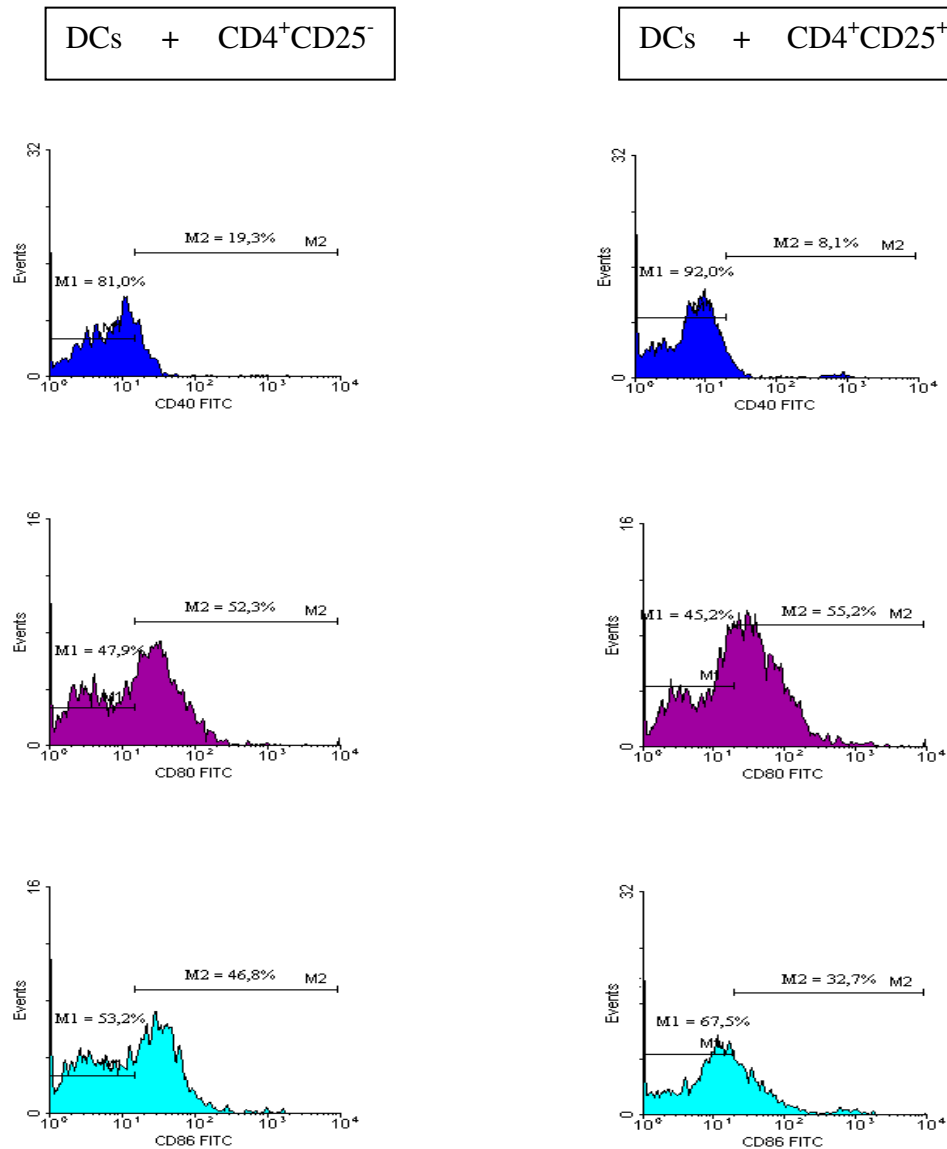
Anschließend wurde mittels FACS-Analyse die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 detektiert, die nach Aktivierung von DCs hochreguliert werden. Zudem wurde als weiterer Marker einer eventuellen Stimulation der dendritischen Zellen mittels intrazytoplasmatischer FACS-Färbung die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-12 nach Kokultur und anschließender Stimulation mit CpG bestimmt.

### **3.3.1 Kokultur mit isolierten T-Zellen der Milz & DCs**

#### **3.3.1.1 Kokultur von DCs mit aus der Milz gesunder Balb/c Mäuse isolierten T-Zell-Subpopulationen**

Zunächst wurden die Experimente mit Zellen, die aus der Milz gesunder Balb/c-Mäuse isoliert wurden, durchgeführt.

Das erste Experimente gab Hinweise auf mögliche suppressive Effekte der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen auf die kokultivierten DCs. DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen inkubiert wurden, exprimierten (ohne Stimulation mit CpG) zu 19,3% CD40 im Gegensatz zu DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> kultiviert wurden, die CD40 nur zu 8,1% aufwiesen. Demgegenüber zeigten sowohl DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen kokultiviert wurden, als auch DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen inkubiert zu einem hohen Prozentsatz Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 (52,3% versus 55,3%). Anders verhielt es sich für die Expression von CD86, welches auf DCs die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T Zellen kokultiviert wurden zu 46,8% und auf DCs in Kokultur mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten lediglich bei 32,7% der DCs nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.28).



3.28 Darstellung der CD40-, CD80- und CD86-Expression unstimulierter DCs der Milz-Kokultur als Histogramme nach FITC-markierter Färbung und FACS Analyse des 1. Exp.

DCs alleine exprimierten MHC II zu 45,6%. Die CpG stimulierten DCs zu 59,6%. Bei Kokultur mit T-Zellen der Milz zeigten sich sowohl bei den DCs, die mit unstimulierten als auch bei denen, die mit CpG-stimuliert waren, höhere Werte, wobei sich der Einfluss der Kokultur mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen nur wenig voneinander unterschied. Ähnlich verhielt sich auch die CD40-, CD80- und CD86-Expression: Unstimulierte DCs exprimierten nur zu einem geringen Prozentsatz diese CD-Marker, wurden sie allerdings mit CpG stimuliert, konnten beispielsweise Werte von 8% für CD40, 45,6% für CD80 und 46% für CD86 erreicht werden (s. Tab. 3.9). Die DCs der Kokultur zeigten schon unstimuliert hohe Werte für CD40 (DCs & CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 5,5% vs. DCs & CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 3,1%), CD80 (DCs & CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 44% vs. DCs & CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

41,5%) und CD86 (DCs % CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> 39,4% vs. 34%). Die CpG-Stimulation erhöhte den Prozentsatz positiver Zellen erwartungsgemäß nochmals, jedoch jeweils nur geringfügig.

Die DC-Kokultur mit Milzzellen gesunder Tiere wiederholten wir viermal. Bei dem 3. Experiment konnten nur die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen gemessen werden und sind im Folgenden nicht in der Gesamtstatistik aufgeführt.

Die Ergebnisse der unstimulierten DCs des 4. Experiments ähnelt den oben angeführten, bei der 2. Durchführung konnte kein eindeutiger suppressiver Effekt der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen gegenüber den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen verzeichnet werden (s. Tab. 3.9). Insgesamt differieren die gemessenen Expressionen der Oberflächenmarker nur wenig, so dass hiermit noch keine Aussage zu einer möglichen Suppression getroffen werden kann. Es ergibt sich lediglich eine Tendenz für CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen eine stärkere suppressive Wirkung auf dendritische Zellen auszuüben als CD25<sup>-</sup>-Lymphozyten.

*Tabelle 3.9 Übersicht der Expression von MHC II, CD40, CD80 und CD86 auf DCs aus der Kokultur mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen isoliert von der Milz gesunder Tiere*

	DCs unstim.	Milz CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> & DCs unstim.					Milz CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> & DCs unstim.				
	Mittelwert	1. Exp	2. Exp	3. Exp.	4. Exp.	Mittelwert	1. Exp	2. Exp	3. Exp.	4. Exp.	Mittelwert
<b>ko</b>	3,3	2,8	2,7	n.u.	1,5	2,3	3,0	2,7	n.u.	1,6	2,4
<b>Mhc2</b>	55,6	64,0	71,9	n.u.	56,0	64,0	58,3	74,2	n.u.	53,2	61,9
<b>CD40</b>	7,9	19,3	27,9	n.u.	5,5	17,6	8,1	41,8	n.u.	3,1	17,7
<b>CD80</b>	41,6	52,3	74,8	n.u.	44,0	57,0	55,2	77,0	n.u.	41,5	57,9
<b>CD86</b>	22,6	46,8	72,0	n.u.	39,4	52,7	32,7	75,2	n.u.	34,0	47,3
	DCs CpG stim.	Milz CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> & DCs CpG stim.					Milz CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> & DCs CpG stim.				
	Mittelwert	1. Exp	2. Exp	3. Exp	4. Exp.	Mittelwert	1. Exp	2. Exp	3. Exp.	4. Exp.	Mittelwert
<b>ko</b>	2,3	2,5	2,4	n.u.	1,5	2,1	3,2	2,4	n.u.	1,5	2,4
<b>Mhc2</b>	60,1	65,4	63,8	n.u.	56,0	61,7	53,2	71,0	n.u.	61,5	61,9
<b>CD40</b>	13,2	15,0	30,5	n.u.	10,0	18,5	7,4	20,0	n.u.	6,4	11,3
<b>CD80</b>	41,8	43,9	66,5	n.u.	60,6	57,0	17,6	80,8	n.u.	61,3	53,2
<b>CD86</b>	37,2	36,0	62,5	n.u.	58,8	52,4	21,2	63,4	n.u.	54,0	46,2



### 3.3.1.2 Kokultur von DCs mit aus Milzen erkrankter SCID-Tiere isolierten T-Zellen

DCs, die über 70 h mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus Milzen erkrankter Tiere inkubiert wurden, zeigten ein ähnliches Verhalten wie DCs, die mit T-Zellen gesunder Tiere kokultiviert worden waren. CD40 wurde von den DCs der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Kokultur zu 8,0%, CD86 zu 31,9% exprimiert. Bei den DCs, der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Kokultur zeigten sich mit CD40 3,3% und CD86 28,7% niedrigere Expressionen. CD80 wurde von den DCs der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Kokultur mit 21,8% zu einem geringeren Prozentsatz produziert.

Tabelle 3.10 Übersicht der Expression von MHC II, CD40, CD80 und CD86 auf DCs aus Kokulturen mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus Milzen erkrankter Tiere

	DCs unstim.	Milz CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> & DCs unstim.	Milz CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> & DCs unstim.
		1. Transfer	1. Transfer
<b>ko</b>	1,2	2,1	
<b>Mhc2</b>	56,8	42,7	
<b>CD40</b>	7,6	8,0	3,3
<b>CD80</b>	17,4	21,8	27,0
<b>CD86</b>	12,7	31,9	28,7

	DCs CpG stim.	Milz CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> & DCs CpG stim.	Milz CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> & DCs CpG stim.
		1. Transfer	1. Transfer
<b>ko</b>	1,5	1,3	
<b>Mhc2</b>	32,1	57,6	
<b>CD40</b>	1,3	4,8	14,4
<b>CD80</b>	2,0	48,9	63,8
<b>CD86</b>	1,7	47,2	58,0

Nach CpG-Stimulation beider Kokulturen, ließen sich bei DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen inkubiert worden waren, durchweg niedrigere Werte für CD40 (4,8%), CD80

(48,9%) und CD86 (47,2%) verzeichnen als bei DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen in Kontakt standen (CD40 14,4%, CD80 63,8% und CD86 58,0%).

### **3.3.2 Kokulturen mit isolierten Lamina propria-T-Lymphozyten & DCs**

#### **3.3.2.1 Kokultur mit isolierten Lamina propria-T-Lymphozyten gesunder Balb/c Mäuse & DCs**

DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen inkubiert wurden, exprimierten zu 10,6% CD40, zu 56,6% CD80 und CD86 zu 54,2%. Bei den DCs der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Kokulturen fanden sich folgende Werte: CD40 5,6%, CD80 48,4% und CD86 42,0%. Die DCs wurden insgesamt mit T-Zellen stärker aktiviert als ohne. In Stimulationsexperimenten, bei denen den Zellen der Kokultur CpG zugegeben wurde, zeigte sich sowohl bei der Kontrolle (DCs alleine) als auch bei den DCs der Kokulturen zu einem größeren Prozentsatz der Zellen die Expression von CD40, CD80 und CD86. Die DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen kokultiviert worden waren, zeigten zu 15%, diejenigen, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen inkubiert worden waren, zu 16,5% CD40. CD80 wurde von den DCs der ersten Gruppe zu 56,5% und von der letzteren zu 62,5% exprimiert. Beim Nachweis von CD86 zeigte sich ebenfalls, dass die Expression nach Stimulation der DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen inkubiert wurden, mit 51,5% niedriger war als bei DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen kokultiviert worden waren. Nur in einer Kokultur zeigten sich – wie wir eigentlich erwartet hatten - einmalig erniedrigte Werte für die CD40- und CD86-Expression bei den stimulierten DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lamina propria Lymphozyten kokultiviert wurden.

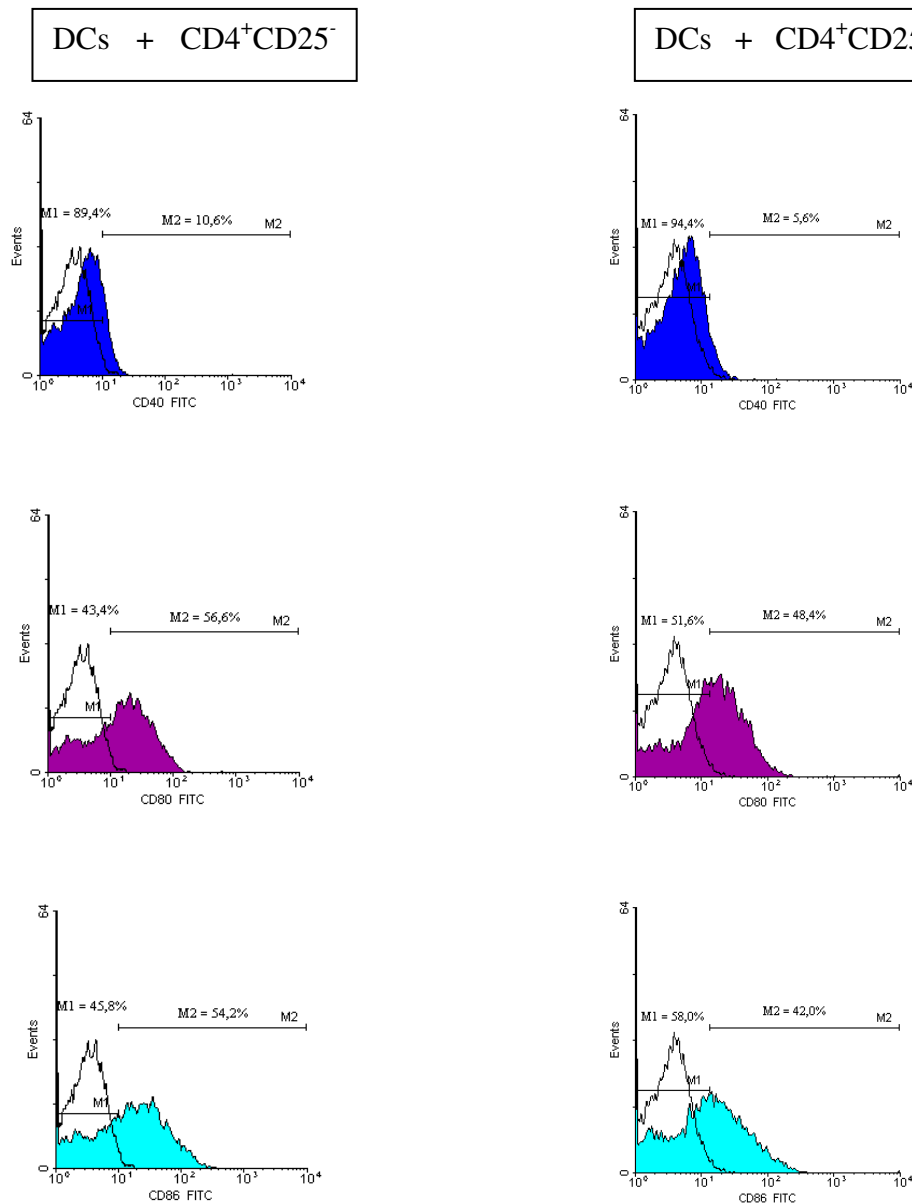


Abbildung 3.29 Darstellung der Expression von CD40, CD80 und CD86 von unstimulierten DCs, die mit  $CD4^+CD25^-$ - oder  $CD4^+CD25^+$ -Lp-Zellen gesunder Balb/c-Tiere inkubiert wurden

Das 2. Experiment mit gesunden Balb/c-Tieren zeigte für unstimulierte DCs ähnliche Verhältnisse wie das oben geschriebene, wenn auch mit insgesamt niedrigeren Prozentzahlen für CD40, CD80 und CD86-Expressionen (s. Tab. 3.11).

Tabelle 3.11 Aktivierung der DCs nach 70h Kokultur mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Lymphozyten aus Lamina propria gesunder Balb/c-Mäuse

	DCs unstim.	LpL CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> & DCs unstim.					LpL CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> & DC unstim.				
	Mittelwert	1.Exp	2.Exp	3.Exp	4.Exp	Mittelwert	1.Exp	2.Exp	3.Exp	4.Exp	Mittelwert
<b>Ko</b>	3,9	n.u.	n.u.	1,2	1,5	1,4	n.u.	n.u.	2,7	1,5	2,1
<b>Mhc2</b>	51,7	n.u.	n.u.	53,1	53,8	53,5	n.u.	n.u.	55,8	n.u.	55,8
<b>CD40</b>	2,8	n.u.	n.u.	2,6	10,6	6,6	n.u.	n.u.	3,1	5,6	4,4
<b>CD80</b>	26,2	n.u.	n.u.	37,2	56,6	46,9	n.u.	n.u.	36,8	48,4	42,6
<b>CD86</b>	16,5	n.u.	n.u.	25,0	54,2	39,6	n.u.	n.u.	18,3	42,0	30,2

	DCs stim.	LpL CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> & DCs CpG stim.					LpL CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> & DC CpG stim.				
	Mittelwert	1.Exp	2.Exp	3.Exp	4.Exp	Mittelwert	1.Exp	2.Exp	3.Exp	4.Exp	Mittelwert
<b>Ko</b>	2	n.u.	n.u.	2,2	1,5	1,9	n.u.	n.u.	1,0	1,5	1,3
<b>Mhc2</b>	58,9	n.u.	n.u.	63,8	47,5	55,7	n.u.	n.u.	53,8	n.u.	53,8
<b>CD40</b>	10,4	n.u.	n.u.	12,9	15,0	14,0	n.u.	n.u.	14,8	16,5	15,7
<b>CD80</b>	35,7	n.u.	n.u.	50,6	56,5	53,6	n.u.	n.u.	45,2	62,5	53,9
<b>CD86</b>	33,5	n.u.	n.u.	44,0	51,5	47,8	n.u.	n.u.	n.u.	60,0	60,0

Bei den CpG-stimulierten DCs des 2. Experiment ließ sich bei annähernd gleichen Zahlen für die CD40, CD80 und CD86-Expression der DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> - und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen inkubiert wurden, kein eindeutiger Unterschied feststellen.

### 3.3.2.2 Kokultur mit isolierten Lamina propria-T-Lymphozyten erkrankter SCID-Tiere & DCs

DCs, die mit Medium 70h alleine inkubiert und nicht CpG-stimuliert wurden, zeigten eine CD40-Expression von 2,8%, eine CD80-Expression von 28,6% und eine CD86-Expression von 6,4%. Wurden die DCs mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Lamina propria- T-Lymphozyten inkubiert, die aus Mäusen mit Transfercolitis isoliert worden waren, konnten die kostimulatorischen Moleküle zu einem deutlich höheren Prozentsatz (CD40 zu 4,6%, CD80 zu 68,0% und CD86 zu 42,3%) auf den DCs detektiert werden. Für alle drei untersuchten Oberflächenmoleküle ließ sich somit eine vermehrte Expression nachweisen, die für eine stärkere Aktivierung der DCs unter diesen Bedingungen

sprach. Demgegenüber wurden bei DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lamina propria T-Lymphozyten kokultiviert wurden, CD40-Werte von 6,0%, CD80-Werte von 45,7% und CD86-Werte von 19,8% gemessen. Die Expression von CD80 und CD86 auf der Zellmembran von DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen inkubiert wurden, waren somit gegenüber denen der DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen in Kultur gehalten wurden, deutlich vermindert, wohingegen sich kein wesentlicher Unterschied für die Expression von CD40 fand. Wie auch bei vorhergehenden Experimenten beschrieben, waren die DCs nach Kokultur stärker aktiviert als DCs ohne T-Zellen. Dabei schienen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen die Aktivierung, die normalerweise durch die Anwesenheit der T-Zellen induziert wird, bremsen zu können.

Tabelle 3.12 Übersicht der Expression von MHC II, CD40, CD80 und CD86 auf DCs aus Kokulturen mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus der Lamina propria erkrankter Tiere

	DCs unstim.	LpL CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> & DCs unstim.			LpL CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> & DCs unstim.		
	Mittelwert	1. Transfer	2. Transfer	Mittelwert	1. Transfer	2. Transfer	Mittelwert
<b>ko</b>	1,2	1,4	1,3	1,4		2,5	2,5
<b>Mhc2</b>	53,1	37,8	74,6	56,2	42,0	67,0	54,5
<b>CD40</b>	5,2	1,7	4,6	3,2	32,0	6,0	19,0
<b>CD80</b>	23	16,8	68,0	42,4	22,0	45,7	33,9
<b>CD86</b>	9,6	22,5	42,3	32,4	21,7	19,8	20,8

	DCs stim.	LpL CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> & DCs CpG stim.			LpL CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> & DCs CpG stim.		
	Mittelwert	1. Transfer	2. Transfer	Mittelwert	1. Transfer	2. Transfer	Mittelwert
<b>ko</b>	1,4	1,4	1,0	1,2		3,5	3,5
<b>Mhc2</b>	45,6	40,0	70,4	55,2		48,8	48,8
<b>CD40</b>	3,6	1,5	6,0	3,8	2,6	2,8	2,7
<b>CD80</b>	14,4	29,5	64,7	47,1	24,6	13,9	19,3
<b>CD86</b>	5,9	28,5	40,0	34,3	27,3	8,0	17,7

Durch CpG-Stimulation ließ sich bei den DCs alleine CD40 zu 5,8%, CD80 zu 26,8% und CD86 zu 10,0% nachweisen. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-DCs-Kokultur führte bei den DCs zu 6,0% CD40-, 64,7% CD80- und 40,0% CD86-Expressionen, bei den DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen in Kokultur waren zu CD40-Werten von 2,8%, CD80-Werten von

13,9% und CD86-Werten von 8,0%. Damit war die Aktivierung der DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen inkubiert wurden, nach CpG-Stimulation am stärksten, gefolgt von den DCs plus Medium. Die DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen in Kokultur gehalten wurden, erzielten für die Oberflächenexpression der Aktivitätsmarker die geringsten Resultate.

Die Tendenz zur Suppression der Aktivität der DCs durch Kokultur mit Lamina propria-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen konnte durch Wiederholung des Experiments ein weiteres Mal bestätigt werden (siehe 1. Transfer Tab. 3.12).

Kokulturexperimente mit dendritischen Zellen und T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten konnten leider aufgrund der zu geringen Zellzahlen, die sich aus mesenterialen Lymphknoten gewinnen lassen, nicht durchgeführt werden.

### **3.3.3 IL-12 in der Kokultur**

Neben den zellulären Veränderungen der dendritischen Zellen, die im Rahmen der Kokultur mit regulatorischen T-Zellen auftreten, konzentrierten wir uns in weiteren Untersuchungen auf die humorale Antwort der DCs. Dabei stand das Interleukin 12 (IL-12), das der Gruppe der proinflammatorisch wirkenden Zytokine zugeteilt wird, im Mittelpunkt des Interesses, da es von aktivierten DCs vermehrt sezerniert wird und damit ebenfalls als Marker für eine Aktivierung dieser Zellen eingesetzt werden kann. Nachdem gezeigt werden konnte, dass T<sub>reg</sub>-Zellen Einfluss auf die DCs nehmen konnten, wollten wir untersuchen, ob DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen kokultiviert werden, auch vermindert IL-12 sezernieren.

#### **3.3.3.1 IL-12 in der Kokultur von DCs mit T-Zellen isoliert aus Organen gesunder Tiere**

Unsere Messungen ergaben, dass DCs, die mit Milz-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen inkubiert wurden, nach Kokultur zu 18,9% IL-12 produzierten, wohingegen lediglich 12,5% der DCs, die mit Milz-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatorischen Zellen kokultiviert wurden, dieses Zytokin sezernierten (s. Tab. 3.13). DCs, die sich nicht in Kokultur mit T-Zellen befanden, wiesen hingegen zu 23,5% eine Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-12 nach Stimulation mit CpG auf. Somit scheint die Anwesenheit von T-Zellen die Sekretion von IL-12 von DCs zu reduzieren, wobei die CD25<sup>+</sup>-Subpopulation offenbar die stärkste inhibierende Wirkung zu zeigen scheint. Bei DCs, die mit Lamina propria-

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen kultiviert wurden, fanden sich prozentual ebenfalls mehr IL-12-produzierende Zellen (34,1%) als bei DCs, die in Kontakt mit Lamina propria-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen kultiviert worden waren (24,9%). Insgesamt lag die IL-12-Produktion jedoch höher als bei den Milzzellen und den DCs alleine.

Die IL-12-Bestimmung wurde bei drei verschiedenen Kokulturen durchgeführt und zeigte stets das oben beschriebene Verhalten der Zellen.

*Tabelle 3.13 Intrazytoplasmatische Bestimmung der IL-12-Sekretion nach 70 h Kokultur mit Milz-Zellen gesunder Balb/c-Mäuse (Zellen 8 h vor Färbung mit Golgi Plaque behandelt)*

	Messung von Interleukin-12 intrazytoplasmatisch		
	1. Experiment	2. Experiment	3. Experiment
<b>DC CpG stimuliert</b>	25,5%	57,2%	23,5%
<b>DC + CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Milzzellen CpG stimuliert, gesund</b>	22,8%	38,3%	18,9%
<b>DC + CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Milzzellen CpG stimuliert, gesund</b>	10,4%	30,9%	12,5%

*Tabelle 3.14 Intrazytoplasmatische Bestimmung der IL-12-Sekretion nach 70 h Kokultur mit Lamina propria-Zellen gesunder Balb/c-Mäuse (Zellen 8 h vor Färbung mit Golgi Plaque behandelt)*

	Messung von Interleukin-12 intrazytoplasmatisch		
	1. Experiment	2. Experiment	3. Experiment
<b>DC CpG stimuliert</b>			23,5%
<b>DC + CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> LpL CpG stimuliert, gesund</b>			34,1%
<b>DC + CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> LpL CpG stimuliert, gesund</b>			24,9%

### 3.3.3.2 IL-12 in der Kokultur erkrankter Tiere

Bei der intrazytoplasmatischen IL-12-Messung der DCs, die mit Zellen erkrankter SCID-Mäuse kokultiviert wurden, zeigte sich ähnlich wie bei den DCs, die mit Zellen gesunder Tiere inkubiert wurden, dass die Kokultur mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Milzzellen zu einer verminderten IL-12-Sekretion führte (7,8%). Demgegenüber wurde bei den DCs,

die mit  $CD4^+CD25^-$ -Milzzellen in Kontakt standen eine doppelt so hohe IL-12-Produktion verzeichnet (15,3%). Von den DCs, die mit Lamina propria  $CD4^+CD25^+$ -Zellen kokultiviert wurden, wiesen 10,8% eine IL-12-Sekretion auf; von den DCs, die mit  $CD4^+CD25^-$ -Lamina propria-Zellen inkubiert waren, 12,0%.

*Tabelle 3.15: Intrazytoplasmatische Bestimmung der IL-12-Sekretion nach 70 h Kokultur mit Milz-Zellen erkrankter SCID-Mäuse (Zellen 8 h vor Färbung mit Golgi Plaque behandelt)*

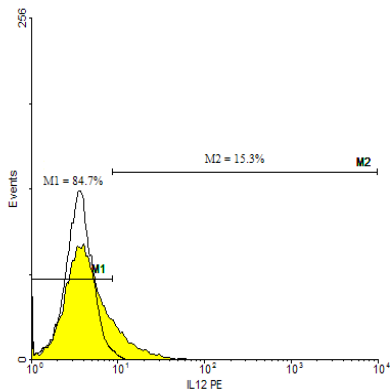
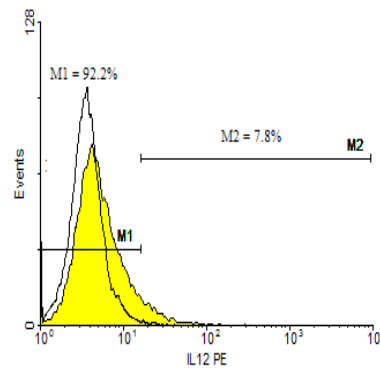
	Messung von Interleukin-12 intrazytoplasmatisch
	1. Transfer
<b>DC CpG stimuliert</b>	5,5%
<b>DC + <math>CD4^+CD25^-</math> Milzzellen CpG stimuliert, krank</b>	15,3%
<b>DC + <math>CD4^+CD25^+</math> Milzzellen CpG stimuliert, krank</b>	7,8%

*Tabelle 3.16: Intrazytoplasmatische Bestimmung der IL-12-Sekretion nach 70 h Kokultur mit Lamina propria-Zellen erkrankter SCID-Mäuse (Zellen 8 h vor Färbung mit Golgi Plaque behandelt)*

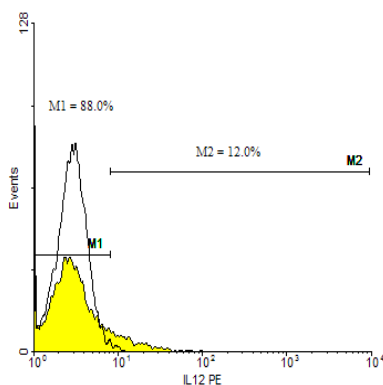
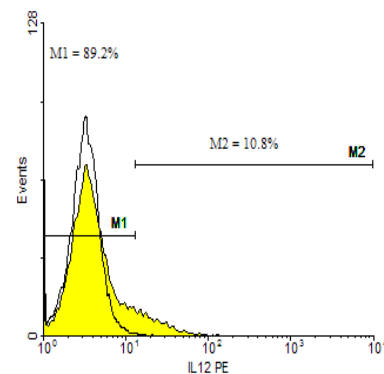
	Messung von Interleukin-12 intrazytoplasmatisch	
	1. Transfer	2. Transfer
<b>DC CpG stimuliert</b>	14,6%	5,5%
<b>DC + <math>CD4^+CD25^-</math> LpL CpG stimuliert, krank</b>	13,2%	12,0%
<b>DC + <math>CD4^+CD25^+</math> LpL CpG stimuliert, krank</b>	24,0%	10,8%

Unter gleichen Bedingungen fand sich bei einem anderen Experiment eine höhere IL-12 Produktion (24,0%) bei DCs, die mit  $CD4^+CD25^+$ -Lamina propria-Zellen inkubiert waren als bei DCs (13,2%), die mit  $CD4^+CD25^-$ -Zellen in Kontakt standen (s. Tabelle 3.16, 1. Transfer).



Kokultur CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (Milz) & DCsKokultur CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Milz) & DCs

a)

Kokultur CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (LpL) & DCsKokultur CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (LpL) & DCs

b)

Abbildung 3.30 Histogramme zur Darstellung der IL-12-FACS-Färbung mit unterlegter Kontrolle nach Kokultur von DCs und Milzzellen aus an Colitis erkrankten SCID-Mäusen  
nach Kokultur von DCs und Lamina propria-Zellen aus an Colitis erkrankten SCID-Mäusen

### 3.3.4 Effekte von Anti-Interleukin-10-Antikörpern in der Kokultur

In unseren Experimenten fanden sich wie oben dargestellt Anhaltspunkte für eine Suppression der Aktivität der DCs durch die Anwesenheit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatorischer T-Zellen. Um weitere Hinweise auf den Mechanismus dieser Suppression zu erhalten – insbesondere ob es sich hierbei um eine durch direkten Zellkontakt oder über Zytokine vermittelte Suppression handelt - wurde in einem Teil der Versuche den Kokulturen ein Anti-IL-10-Antikörper hinzugefügt. Dabei sollte der Anti-IL-10-Antikörper das von

regulatorischen T-Zellen gebildete IL-10 binden und damit dessen Funktion neutralisieren. Die Charakterisierung der Oberflächenmoleküle CD40, CD80 und CD86 der DCs diente erneut als Read-out Parameter für eine mögliche Suppression der Aktivität der DCs.

Tab 3.17 zeigt, dass bei DCs der Kokultur jedoch auch mit einer Konzentration von 20 µg Anti-IL10-Antikörper/ml in Anwesenheit von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lamina propria-Zellen (gesunder Tiere) nur unwesentlich höhere Werte für CD40 (19,6% vs. 16,5%), CD80 (62,5% vs. 55,7%) und CD86 (60,0% vs. 55,4%) als bei DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen allerdings ohne Antikörper kultiviert wurden – messbar waren. Bei den Kokulturen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Lymphozyten mit DCs ließ sich nahezu kein Unterschied festmachen: CD40 wurde von den DCs ohne Anti-IL-10-Antikörper zu 15,0%, in Anwesenheit des Antikörpers zu 14,6%, CD80 56,5% versus 54,6% und CD86 51,5% versus 51,8% gemessen.

*Tabelle 3.17 Messung der Aktivierung von CpG stim. DCs und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lamina propria Zellen im Vergleich bei Zugabe von 20 µg/ml Anti-Interleukin-10-Antikörper zur Kokultur und ohne Zusatz*

	<b>LpL CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (gesunder Tiere) &amp; DCs CpG</b>	<b>LpL CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (gesunder Tiere) &amp; DCs CpG</b>
<b>ko</b>	1,5%	1,5%
<b>CD40</b>	15,0%	16,5%
<b>CD80</b>	56,5%	62,5%
<b>CD86</b>	51,5%	60,0%
	<b>LpL CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (gesunder Tiere) &amp; DCs CpG &amp; Anti-IL10-AK</b>	<b>LpL CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (gesunder Tiere) &amp; DCs CpG &amp; Anti-IL10-AK</b>
<b>CD40</b>	14,6%	19,6%
<b>CD80</b>	54,6%	55,7%
<b>CD86</b>	51,8%	55,4%

Bei Addition von Anti-IL-10-Antikörpern zu Kokulturen mit T-Zellen, die aus erkrankten Tieren isoliert wurden, konnte ein stärkerer Effekt auf die DCs verzeichnet werden. DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der Lamina propria inkubiert wurden, wiesen ohne Anti-IL10-Antikörper CD86 zu 27,3% auf. Wurde der Anti-IL-10 Antikörper der Kokultur hinzugefügt und damit die supprimierende Wirkung des sezernierten IL-10 inhibiert, waren 42,9% der DCs positiv für CD86 (siehe Tab. 3.18). Interessanterweise

ließ sich dieser Einfluss des Anti-IL-10-Antikörpers auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle auch bei Zellen, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Lymphozyten kokultiviert wurden, detektieren. So stieg hier der Prozentsatz CD80-positiver DCs von 29,5% auf 40,6% in Anwesenheit des Anti-IL10-Antikörpers und die CD86-Expression von 28,5% auf 42,5% an.

*Tabelle 3.18 Messung der Aktivierung von CpG stim. DCs und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>- bzw. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lamina propria-Zellen aus erkrankten SCID-Tieren im Vergleich bei Zugabe von 20 µg/ml Anti-Interleukin zur Kokultur und ohne Zusatz*

	<b>LpL CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (erkrankter Tiere) &amp; DCs CpG</b>	<b>LpL CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (erkrankter Tiere) &amp; DCs CpG</b>
<b>CD40</b>	1,5	2,6
<b>CD80</b>	29,5	24,6
<b>CD86</b>	28,5	27,3
	<b>LpL CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (erkrankter Tiere) &amp; DCs CpG &amp; Anti-IL10-AK</b>	<b>LpL CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (erkrankter Tiere) &amp; DCs CpG &amp; Anti-IL10-AK</b>
<b>CD40</b>	1,3	6,5
<b>CD80</b>	40,6	n.u.
<b>CD86</b>	42,5	42,9

Dieses Experiment konnte jedoch aufgrund der geringen Zellzahlen der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lamina propria Lymphozyten nur einmal durchgeführt werden, so dass weitere Untersuchungen nötig wären, um eine fundierte Aussage über die Vermittlung der Suppression treffen zu können.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass T-Lymphozyten, die phänotypische Marker regulatorischer T-Zellen tragen und damit regulatorischen T-Zellen zu entsprechen scheinen, aus mukosalen Geweben wie mesenterialen Lymphknoten und der intestinalen Lamina propria, sowie der Milz isoliert werden konnten. Diese Beobachtung deckt sich mit der Literatur, die beschreibt, dass dies die bevorzugten Orte für die Ansammlung dieser Zellen sind<sup>55</sup>.

In den durchgeführten Experimenten fand sich prozentual die größte Anzahl  $CD4^+CD25^+$ -Lymphozyten in mesenterialen Lymphknoten gefolgt von der Lamina propria. Dies ließ sich sowohl bei gesunden Tieren als auch bei Mäusen mit chronischer Colitis beobachten.

Interessanterweise war dabei die Anzahl der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen, die aus den mesenterialen Lymphknoten und der Lamina propria erkrankter Tieren isoliert werden konnte im Vergleich zu der Anzahl, die aus gesunden Tieren isoliert werden konnte, deutlich höher. Demgegenüber nahm die Anzahl der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen, die aus Milzen erkrankter Tiere isoliert wurden, ab. Besonders bemerkenswert ist die teilweises Verhundertfache der Anzahl  $CD4^+CD25^+$ -Zellen in der Lamina propria erkrankter Tiere. Dass es sich bei diesen  $CD25^+$ -Zellen nicht lediglich um aktivierte T-Zellen handelt, die die chronische Entzündung perpetuieren, konnte dadurch bestätigt werden, dass die Lymphozyten Marker regulatorischer T-Zellen wie foxP3 und  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin trugen. Diese Ergebnisse könnten somit dafür sprechen, dass es im Rahmen einer chronischen Entzündungssituation zu einer vermehrten Rekrutierung regulatorischer  $CD4^+CD25^+$ -Zellen in die entzündlich veränderten Gewebe kommt, um die überschießende Immunreaktion in diesen Arealen zu „bremsen“ und wieder eine immunologische Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Mechanismen zu erreichen. Auch in der lymphatisch nachgeschalteten Region, den mesenterialen Lymphknoten, findet man bei erkrankten Tieren mehr  $CD4^+CD25^+$ -Zellen. Dass sich prozentual mehr  $CD4^+CD25^+$ -Zellen in den mesenterialen Lymphknoten – wie in unseren Experimenten aufgezeigt – als in der intestinalen Lamina propria finden, könnte ein Ausdruck für die hohe immunologische Aktivität der betroffenen Lymphknoten sein, die – möglicherweise als Reaktion auf den entzündlichen Stimulus – mehr T-Zellen zur  $CD4^+CD25^+$ -Differenzierung anregen.

Wie oben bereits erwähnt kann die Expression von CD25 auf der Zelloberfläche nicht automatisch mit regulativer Aktivität in Verbindung gebracht werden. In den letzten Jahren sind jedoch zahlreiche weitere Marker – darunter auch das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin und foxp3 – beschrieben worden, die sich auf aktivierten regulatorischen T-Zellen finden lassen. Nachdem in unseren Experimenten die T-Lymphozyten auf das Vorhandensein von CD25 untersucht worden waren, führten wir weitere Experimente zur Phänotypisierung dieser Zellen durch.

Dabei konnten wir zeigen, dass  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin sowohl auf der Oberfläche von  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen gesunder als auch erkrankter Tiere nachweisbar ist. Die Bestätigung gelang uns bei den  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen aller untersuchten Gewebearten (Milz, mLK und Lp). Etwa 20% der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen aus Milz, mLK und Lp gesunder Tiere exprimierten dabei das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin. Die  $CD4^+CD25^+$ -Zellen, die wir aus erkrankten Tieren isolierten, zeigten mit 70-80% positiven Zellen eine deutliche Zunahme der  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin-Expression. Die Expression von  $\alpha_E\beta_7$  war auf Zellen der Lamina propria erkrankter Tiere am höchsten, was auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden konnte <sup>69</sup>. Bemerkenswert scheint, dass bei den  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen, die von an Colitis erkrankten SCID-Tieren stammten – im Gegensatz zu der unstimulierten „Grund-Expression“ der gesunden T-Zellen – eine prozentual stark erhöhte  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin-Expression gemessen werden konnte. Während nur etwa 20% aller gesunden  $CD4^+CD25^+$ -Zellen  $\alpha_E\beta_7$  exprimierten, stieg die Expression von  $\alpha_E\beta_7$  bei den  $CD4^+CD25^+$ -Zellen der erkrankten Tiere auf bis zu 80% der Gesamtpopulation an. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass dem mukosalen Integrin- $\alpha_E\beta_7$  eine wesentliche Rolle zukommen könnte, wenn die Tiere an einer Colitis erkranken. Die Expression des  $\alpha_E\beta_7$ -Integrins könnte dabei zum einen peripheren  $CD4^+CD25^+$ -Zellen die Migration in entzündlich veränderte intestinale Mukosa ermöglichen, zum anderen spezifisch direkte Zell-Zell-Interaktionen intensivieren und hierüber möglicherweise eine suppressive Funktion vermitteln. Die Frage, ob die Expression des  $\alpha_E\beta_7$ -Integrins direkt für die Funktion  $CD4^+CD25^+$ -regulatorischer Zellen wichtig ist oder lediglich einen phänotypischen Marker für diese Zellpopulation darstellt, konnte bisher noch nicht ausreichend geklärt werden. So widerlegten Annacker et al. <sup>51</sup> in ihren Arbeiten die bisher herrschende Ansicht, dass das Vorhandensein von  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf  $CD4^+CD25^+$ -Zellen obligatorisch für deren Funktion als regulatorische T-Zellen ist. Sowohl der Transfer von  $CD4^+CD25^+\alpha_E^+$ -als auch von  $CD4^+CD25^+\alpha_E^-$ -Zellen konnte eine durch

CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>-Zellen hervorgerufene Colitis in SCID-Tieren abschwächen. Bestärkt wird dies durch weitere Daten, die zeigen, dass auch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen von  $\beta_7$ -knock out-Mäusen – die somit kein  $\alpha_E\beta_7$  exprimieren – eine Transfercolitis verhindern können. Weder klinisch noch histologisch ergaben sich dabei Hinweise für eine Entzündung des Colons nach Transfer der regulatorischen Zellen<sup>70</sup>.

Da das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin in der letzten Zeit auch auf der Oberfläche nicht-lymphozytärer Zellen wie beispielsweise DCs beschrieben wurde, wird in der Literatur zunehmend darüber diskutiert, ob das von diesen Zellen präsentierte  $\alpha_E\beta_7$  von Bedeutung für die Interaktion von DCs mit T-Zellen sein könnte. Diese Vermutung stützt sich auf Beobachtungen, dass auch anderen  $\alpha_E$ -positiven Zellen eine regulatorische Wirkung zugeschrieben werden konnte<sup>51</sup>.

Interessanterweise fanden wir neben der Expression auf CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten in unseren Experimenten auch eine deutlich vermehrte  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin-Expression auf CD25<sup>-</sup>-T-Zellen aus mLK und Lamina propria von Tieren mit Colitis, während bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen, die aus gesunden Tieren isoliert wurden, ebenso wie auf aus der Milz erkrankter Mäuse isolierten Lymphozyten, keine signifikante  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin-Expression nachgewiesen werden konnte. Dass eine Subpopulation CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen, die regulatorische Funktion besitzt, ebenfalls das  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin exprimiert, wurde auch von Lehmann et al.<sup>71</sup> beobachtet. Die Autoren diskutieren, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen – trotz ihrer Negativität für CD25 – regulatorisch aktiv seien und durch ihre dann vorhandene Positivität für  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auffindig gemacht werden könnten. Dabei konnten die regulatorischen CD25-negativen Lymphozyten neben ihrer Expression des  $\alpha_E\beta_7$ -Integrins noch durch die Expression von CTLA-4 und die Sekretion von IL-2, IFN- $\gamma$  und T<sub>H</sub>2-Zytokinen charakterisiert werden. In unseren Untersuchungen wurde die Expression von CTLA-4 auf den isolierten T-Zell-Populationen nicht untersucht, so dass wir lediglich vermuten können, dass die von uns aus mLK und LP von Colitis-Tieren isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> $\alpha_E$ <sup>+</sup>-Lymphozytenpopulation dieser beschriebenen Zellpopulation entsprechen könnte.

Die Hypothese, dass auch CD25<sup>-</sup>-negative Zellen regulatorische Aktivität aufweisen können, wurde in den letzten Jahren immer wieder diskutiert. Sowohl die Arbeitsgruppen von Read et al.<sup>36</sup> als auch die von Annacker et al.<sup>72</sup> hatten beobachtet, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen in der Lage waren, nach Kotransfer eine Colitis im

Mausmodell zu inhibieren. Hierfür war jedoch der Transfer einer deutlich größeren Zellzahl notwendig als sie für die Inhibierung der Colitis nach Transfer regulatorischer CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten benötigt wurde. Daraus ließe sich schlussfolgern, dass sich unter den CD25<sup>-</sup>-T-Zellen ebenfalls regulatorische T-Zellen befinden könnten, die jedoch in ihrer suppressiven Funktion der der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen unterlegen ist. Es wäre denkbar, dass im Verlauf einer chronischen Entzündung wie sie die Transfercolitis darstellt zusätzliche regulatorische Zellen generiert werden, um die Entzündung in Griff zu bekommen.

Verschiedene Arbeiten konnten demonstrieren, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen regulatorische Aktivität aufnehmen, wenn sie mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen in Kontakt gestanden hatten<sup>73, 74</sup>. Hierdurch könnte sich erklären lassen, warum sich bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen aus mLK und Lp von Tieren, die an einer Colitis erkrankt waren, ebenfalls Charakteristika regulatorischer Zellen ( $\alpha_E\beta_7$ -Integrin, IL-10-Produktion) nachweisen ließen.

Umgekehrt exprimieren jedoch nicht alle regulatorischen CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten das  $\alpha_E$ -Integrin. Bei weiteren Untersuchungen, die zum Ziel hatten, Unterschiede zwischen  $\alpha_E\beta_7$ -positiven und  $\alpha_E\beta_7$ -negativen T<sub>reg</sub>-Zellen aufzuzeigen, ergaben sich erste Hinweise, dass sich in entzündlich verändertem Gewebe bevorzugt  $\alpha_E\beta_7$ -positive regulatorische T-Zellen anreichern<sup>75</sup>. Während  $\alpha_E$ -negative CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten L-Selektin und CCR7 exprimierten – was ihnen die Einwanderung in lymphatische Gewebe ermöglichte – exprimierten sowohl die CD25<sup>+</sup> als auch die CD25<sup>-</sup>  $\alpha_E$ -positiven regulatorischen T-Zellen, die einen Effektor/Memory Phänotyp aufwiesen, die Liganden für E- und P-Selektin, verschiedene Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren für inflammatorische Chemokine. Dies scheint ihnen eine effektive Migration in die entzündlich veränderten Gewebe zu ermöglichen. Zudem waren die  $\alpha_E$ -positiven Zellen in der Lage die Entzündung in einem Tiermodell einer chronischen Arthritis effektiver zu inhibieren als dies durch den Transfer  $\alpha_E$ -negativer regulatorischer Zellen der Fall war. Auf dieser Beobachtung basierend, vertreten die Autoren die Ansicht, dass  $\alpha_E\beta_7$ -exprimierende Zellen in entzündlich veränderten Geweben möglicherweise zu einer gewebespezifischen Regulation der Immunantwort beitragen, während  $\alpha_E\beta_7$ -negativen Zellen eher im Sinne einer systemischen Regulation zur Eindämmung einer Entzündung fungieren.

Möglicherweise entspricht somit die von uns detektierte Population  $\alpha_E$ -positiver CD25<sup>-</sup>-Lymphozyten, die sich in den mukosalen Geweben bei Tieren mit Colitis finden ließ, ebenfalls einer Zellpopulation mit regulatorischer Funktion.

Banham et al. beschreiben in einem Übersichtsartikel, dass der Versuch, die Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen alleine über deren Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 zu erreichen, nicht ausreichend war <sup>76</sup>, da die Expression von CD25, insbesondere bei den LpL, bei in-vitro-Kulturen z.T. großen Fluktuationen unterlegen habe <sup>77</sup>. Daher untersuchten wir unsere isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen auf foxp3, einen weiteren Marker, der Zellen mit regulatorischer Aktivität charakterisiert.

Wir konnten zeigen, dass foxp3 intrazellulär bei etwa 50% der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen die aus der Milz gesunder Tiere isoliert wurden und bei 40% der mLK-Zellen zu finden war. Bei den Lamina propria-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen gesunder Tiere zeigten mit nur rund 10% weniger Zellen als in den anderen Geweben eine deutliche foxp3-Expression. Diese Befunde decken sich mit den Angaben aus der Literatur, in denen beschrieben wird, dass nicht alle CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen für foxp3 positiv sind. Bei den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen, die aus Milz, mLK und Lp gesunder Tiere isoliert wurden, konnten wir keine foxp3-Expression aufzeigen.

Eine Arbeitsgruppe, die sich ebenfalls mit der foxp3-Expression tierischer Zellen beschäftigte, konnte neben dem foxp3-Nachweis per FACS, den wir ebenfalls verwendeten, hohe Spiegel an foxp3-mRNA bei den von ihnen isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen messen <sup>39</sup>. Weiter beschreiben diese Autoren, dass nach Stimulation von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen mit anti-CD3 und IL-2 auch aus diesen CD25<sup>-</sup>-negativen Zellen geringe Mengen an foxp3-mRNA isoliert werden konnten. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung konnte durch Stimulation von CD25<sup>+</sup>-Zellen mit anti-CD3 und IL-2 keine vermehrte Expression von foxp3 detektiert werden <sup>39</sup>. Daher vermutete diese Arbeitsgruppe, dass die foxp3-Expression der T<sub>reg</sub>-Zellen stabil und somit unabhängig von ihrer Aktivierung sein könnte <sup>39</sup>.

Demgegenüber konnte in einer anderen Arbeit beobachtet werden, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen nach Stimulation durch antigenpräsentierende Zellen vermehrt regulatorische Marker – u. a. foxp3 – exprimierten und auch regulatorische Aktivitäten zeigten <sup>78</sup>.

Nach Stimulation von humanen, aus der intestinalen Lamina propria isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen mit anti-CD3/CD28-Antikörpern zeigten diese ebenfalls eine Expression von FOXP3- allerdings zu einem geringeren Ausmaß als dies bei den



humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der Fall war <sup>79</sup>. Daher drängt sich die Frage auf, ob CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen in bestimmten Konstellationen zu regulatorischen Zellen werden könnten. Auf diese Hypothese soll später noch näher eingegangen werden.

Unsere Messungen wurden nur an unstimulierten gesunden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen durchgeführt, die einen derartigen Effekt nicht zeigten. Die Inflammation der Colonmukosa erkrankter Tiere, die einer Stimulation der T-Zellen betrachtet gleichgestellt ist, konnte ebenfalls nicht dazu führen, dass die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen foxp3 exprimierten. Nachdem wir die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten gesunder Tiere auf foxp3 untersucht hatten, prüften wir die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen an Colitis erkrankter Mäuse auf die Expression von foxp3. Wie auch bei den gesunden Tieren ließ sich foxp3 durch intrazytoplasmatische FACS-Färbung bei den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen, die aus Milz, mesenterialen Lymphknoten und intestinaler Lamina propria von Tieren mit Colitis isoliert worden waren, demonstrieren. Insgesamt exprimierte insbesondere bei aus Milz und Lamina propria gewonnenen Lymphozyten ein deutlich höherer Prozentsatz als bei aus gesunden Tieren isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen diesen Transkriptionsfaktor. Kürzlich konnte dies auch für mLK-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen von Colitis ulcerosa-Patienten gezeigt werden. Gegenüber gesunden Probanden konnten aus deren mLK mit 66% +/- 8,5% der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten deutlich mehr FOXP3<sup>+</sup>-Zellen isoliert werden <sup>80</sup>. Damit fanden sich ähnliche Zahlenverhältnisse wie bei den von uns untersuchten tierischen mLK-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen: 57% der mLK-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen erkrankter Tiere exprimierten foxp3.

Am deutlichsten konnten wir die Steigerung der foxp3-Expression bei Lamina propria-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der erkrankten Tiere beobachten. Dort wurde im Mittel eine Zunahme der Lymphozyten von 150% im Vergleich zu „ruhenden“ regulatorischen T-Zellen in gesunder Lamina propria beobachtet.

Nach Charakterisierung der von uns verwendeten regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen und ihrer Kontrollgruppe, den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen, führten wir Kokultur-Experimente durch, die Aufschluss über die Interaktion dieser Zellen mit dendritischen Zellen geben sollten. In der Vergangenheit konzentrierten sich die meisten Kokultur-Experimente mit regulatorischen T-Zellen auf die Interaktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen mit CD4<sup>+</sup>-Effektorzellen. So konnte gezeigt werden, dass Milz- und Lp-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen

gesunder Mäuse die Proliferationsrate von CD4<sup>+</sup>-Zellen in einer Kokultur mit APC supprimieren<sup>69, 72</sup>.

In den letzten Jahren wurde immer wieder der Einfluss spezifischer Subpopulationen dendritischer Zellen auf die Generierung regulatorischer T-Zellen beschrieben, Untersuchungen zum Einfluss regulatorischer Lymphozyten auf die Stimulierbarkeit und Aktivierbarkeit dendritischer Zellen sind jedoch selten.

Wir konnten in unseren Kokultur-Experimenten zusammenfassend folgendes finden: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen isoliert aus der Milz gesunder Mäuse konnten deutlicher als die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Milzzellen (insbesondere nach CpG-Stimulation) die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 – die Marker einer Aktivierung der Zellen sind – auf DCs inhibieren. Dieser Effekt ließ sich reproduzieren, wenn auch in dem weiteren Experiment der Unterschied zu den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen nicht sehr stark ausgeprägt war. Bei Verwendung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen erkrankter Tiere konnte dieser Unterschied nur noch bei Kokulturen mit unstimulierten DCs beobachtet werden. Waren die DCs durch CpG stimuliert, zeigte sich kein Unterschied in der Expression der kostimulatorischen Moleküle zwischen mit CD25<sup>+</sup>- und mit CD25<sup>-</sup>-Lymphozyten der Milz kultivierten DCs.

Wurden Lymphozyten eingesetzt, die aus Lamina propria gesunder Tiere isoliert worden waren, zeigten sich bei Kokultur der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen mit unstimulierten DCs wiederum eindeutige suppressive Effekte bezogen auf die Expression kostimulatorischer Moleküle im Vergleich zur Kokultur mit CD25<sup>-</sup>-Zellen. Wurden die DCs zusätzlich mit CpG stimuliert, war auch hier der Unterschied nicht mehr eindeutig. Für die Expression von CD40, CD80 und CD86 ergaben sich dann für die Kokulturen mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen annähernd gleiche Werte.

Am deutlichsten zeigte sich der suppressive Effekt der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen gegenüber den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen in der Kokultur von DCs mit aus der Lamina propria erkrankter Tiere isolierten CD25<sup>+</sup>-T-Lymphozyten. Auch die DCs, die durch CpG zusätzlich stimuliert worden waren, zeigten eine z.T. bis auf die Hälfte niedrigere Aktivierung im Vergleich zu DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen inkubiert worden waren.

Cederbom et al. führten ebenfalls Kokulturexperimente durch<sup>81</sup>. Sie isolierten DCs aus gesunden Balb/c-Milzen und Lymphknoten, die sie über 7 Tage kultivierten. Die Mehrzahl der Kokulturen wurde mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen durchgeführt, die zusammen mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen und DCs in Kultur gebracht wurden. Nach einer zweitägigen

Inkubation erfolgte ihre Auswertung. Die stärkste Suppression der Aktivität erfolgte in Anwesenheit von  $CD4^+CD25^-$ -Zellen und bei hoher  $CD4^+CD25^+/DCs$ -Ratio. Cederbom et al. konnten zudem in weiteren Experimenten zeigen, dass die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 der DCs – wenn in Kokultur mit  $CD4^+CD25^+$ - und/oder  $CD4^+CD25^-$ -Zellen gebracht – herunterreguliert wurden. Anders als in unseren Experimenten beobachteten Cederbom et al. eine Expression der genannten Oberflächenmoleküle, die unterhalb der Basis-Expression der DCs, die nur mit Medium inkubiert wurden, lag. In unseren Experimenten zeigte sich ebenfalls eine leicht geminderte Aktivität der DCs, die allerdings mit egal welcher Subpopulation immer höher war als die der Kontrollgruppe bei der DCs lediglich in Medium – ohne Anwesenheit von T-Lymphozyten – kultiviert wurden. In Kenntnis der Ergebnisse von Cederbom wäre es denkbar, dass in Kokulturen mit  $CD4^+CD25^+$ - und anderen Effektor-Zellen, wie z.B.  $CD4^+$ -Zellen, eine weitere Suppression der DCs möglich wäre.

Park et al. und Chen et al.<sup>56, 82</sup> konnten zeigen, dass  $CD4^+CD25^-$  zu  $CD4^+CD25^+$ -Zellen konvertieren können. Folglich wäre es möglich, dass ein Teil der  $CD4^+CD25^-$ -Zellen während der Kokultur regulatorische Funktion übernommen und damit ebenfalls zu einer Suppression der DC-Aktivität geführt haben könnte. Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, warum die Unterschiede zwischen den beiden Kokultur-Gruppen (mit  $CD25^+$ - bzw.  $CD25^-$ - Lymphozyten) – insbesondere bei den Kokulturen mit aus Milz isolierten Zellen – in unserer Arbeit nicht bei allen durchgeführten Experimenten deutlich ausgeprägt waren. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine erneute FACS-Analyse der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen nach Abschluss der Kokultur gewesen um ggf. zu bestätigen, dass nun auch initial  $CD25^-$ -negative T-Zellen regulatorische Marker aufwiesen. Leider war es aufgrund zu geringer Zellzahlen nicht möglich, eine solche Analyse nach der 70stündigen Kokultur durchzuführen.

Um die reduzierte Expression von CD80 und CD86 der DCs auch molekularbiologisch nachzuweisen, führte die Arbeitsgruppe RT-PCRs durch und konnte belegen, dass zumindest die mRNA des CD80-Markers von dendritischen Zellen, die mit  $CD25^+$ - und  $CD25^-$ -T-Zellen inkubiert worden waren, vermindert war. Bei der mRNA für die Expression von CD86 zeigten sich hingegen keine Unterschiede<sup>81</sup>.

Diese Forschergruppe hatte im Weiteren den Versuch unternommen, APC und  $CD4^+CD25^+$ -Zellen in Transwells mit impermeablen Membranen zu kokultivieren. Bei den APC, die in der oberen Kammer der Wells gesät wurden – durch eine Membran von

den T-Zellen getrennt – konnte der Effekt der Suppression von CD80 und CD86 nicht festgestellt werden. Es wird deshalb vermutet, dass der Zell-Zell-Kontakt – im Gegensatz zu den löslichen Faktoren – eine wichtigere Rolle in der antiinflammatorischen Wirkung einnehmen könnte<sup>81, 83</sup>. Die Vermutung, dass bei der Interaktion von DCs und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der direkte Zellkontakt eine tragende Rolle spielen könnte, lässt sich auch aus den eigenen Versuchen mit Anti-Interleukin-10-Antikörpern in der Kokultur ableiten, was später noch näher erläutert werden soll.

Ergänzende Erkenntnisse können aus einer neueren Arbeit über Tumor-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen und deren Einfluss auf DCs gewonnen werden. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen, die aus Leukämie-Mäusen isoliert wurden, führten in 24stündigen Kokulturen zu einer verminderten Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 und CD40 auf der Oberfläche der untersuchten DCs<sup>84</sup>. Die Arbeitsgruppe führte ihre Kokulturen im Gegensatz zu unseren Kokulturen mit unreiferen DCs (vier Tage alt) und regulatorischen T-Zellen aus Leukämie-Mäusen durch. Dennoch ließen sich ähnliche Resultate, wie wir sie in unseren Kokulturen beobachtet hatten, erzielen. Interessant ist ferner, dass die Forschergruppe beobachten konnte, dass sich unreife DCs besser von den T-regulatorischen Zellen supprimieren ließen als DCs, die sich nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) differenziert hatten. Dies wurde zumindest für die Kokulturen mit Zellen gesunder Tiere in unseren Versuchen ebenfalls beobachtet. Ein zweiter Versuchsansatz dieser Arbeitsgruppe mit dem Einsatz von tierischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus Tumormäusen erbrachte Beweise, wonach DCs auch in-vivo in ihrer Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle, wie es CD40, CD80 und CD86 sind, gebremst werden konnten.

Neben der zelluläre Interaktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen und DCs wollten wir in weiterführenden Experimenten prüfen, ob sie auch in der sekretorischen Funktion Unterschiede finden lassen.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass vorstimulierte DCs, die mit Milz-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen gesunder Tiere kultiviert wurden, IL-12 zu einem geringeren Anteil als DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen inkubiert wurden, sezernierten. DCs alleine (plus Medium) zeigten die stärkste IL-12-Sekretion, gefolgt von DCs & CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen gesunder Milzen. Für die IL-12-Sekretion der DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen inkubiert wurden, konnte die geringste IL-12-Sekretion gemessen werden. Bei Kokultur von Lamina propria-Zellen und DCs war die IL-12-Sekretion der DCs deutlich höher

als die der DCs, die mit Milzzellen inkubiert wurden. Bei Verwendung der Lamina propria-Zellen erkrankter Tiere konnte für DCs, die mit  $CD4^+CD25^+$ -Zellen in Verbindung standen, eine um die Hälfte geringere IL-12-Produktion gemessen werden. Dass auch humane Blut- $CD4^+CD25^+$ -Zellen die IL-12-Sekretion von DCs in Kokulturen supprimieren können, konnte vor kurzem die Arbeit von Bayry et al.<sup>85</sup> zeigen. Diese Arbeitsgruppe konnte eine drastisch erniedrigte IL-12-Konzentration in den Überständen von DCs verzeichnen, die über 24 h mit  $CD4^+CD25^+$ -Zellen in Kontakt standen. Anders als der eigene Versuchsaufbau führten diese Forschergruppe die Messungen in den Überständen der Kokulturen durch, während wir die IL-12-Sekretion der DCs in den letzten 8 h ihrer Kokultur mit Golgi Plaque hemmten, um ihre tatsächlich produzierte Menge an IL-12 zu messen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der DCs- $CD4^+CD25^+$ -Zellkulturen fällt auf, dass auch hier die aus Milzen isolierten  $T_{reg}$ -Zellen zu einer verminderten IL-12-Sekretion der DCs führen konnten. Ähnlich Beobachtungen wurden bei Versuchen mit Tumorgenerierten  $T_{reg}$ -Zellen aus Leukämie-Mäusen verzeichnet. Es zeigte sich, dass diese  $CD4^+CD25^+$ -Tumorzellen die IL-12-Sekretion der DCs in einer 24stündigen Kokultur deutlich senken konnten<sup>84</sup>.

Bei Kokulturen mit Lamina propria-T-Lymphozyten der erkrankten SCID-Mäuse fiel auf, dass die DCs in der Kokultur verhältnismäßig wenig IL-12 sezernierten und kein großer Unterschied zwischen den DCs, die mit  $CD4^+CD25^+$ -Zellen und denen, die mit  $CD4^+CD25^-$ -Zellen kokultiviert worden waren, bestand. Bei rund 10,8% der DCs, die mit  $CD4^+CD25^+$ -Zellen inkubiert waren, konnte intrazytoplasmatisch IL-12 nachgewiesen werden. Bei den DCs der  $CD4^+CD25^-$ -Zell-Kokultur waren es mit 12,0% etwas mehr. Es wäre denkbar, dass die Lamina propria-Lymphozyten in Phasen einer aktiven CED stärker aktiviert sind und deshalb die IL-12-Sekretion stärker als bei gesunden Tieren supprimieren. Warum keine großen Unterschiede zwischen der DCs IL-12-Sekretion von  $CD4^+CD25^+$ - und  $CD4^+CD25^-$ -Kokulturen existieren, lässt sich nicht eindeutig klären. Eine Möglichkeit wäre, dass in der  $CD4^+CD25^-$ -Zellpopulation – wie bereits diskutiert – regulatorische T-Zellen die Suppression bewirken. Jedoch konnte bei den DCs der  $CD4^+CD25^+$ -Kokultur eindeutig eine Suppression ihrer Aktivitätsmarker CD80 und CD86 verzeichnet werden, was bei denen der  $CD4^+CD25^-$ -Zellen nicht gelang. Daher erscheint es eher verwunderlich, wie es den  $CD4^+CD25^-$ -Zellen gelungen ist, die IL-12-Sekretion der DCs so weit herunterzuregulieren.

Da die DCs in der eigenen Arbeit aus gesunden Balb/c-Mäusen stammten, lassen sich aus den dargelegten Experimenten nur Hinweise auf das Verhalten der T-Zellen entnehmen. Aussagen über die tatsächliche Menge an in-vivo produziertem IL-12 lassen sich demnach nur vermuten. Um detailliert Aufschluss über das Verhalten von DCs der erkrankten Organismen und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen zu erhalten, sind weitere Versuche zu diesem Thema notwendig.

Ferner gelang uns der experimentelle Nachweis, dass die von uns isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen dazu fähig waren, IL-10 zu sezernieren.

Bei der Betrachtung der einzelnen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus Milz, mLK und Lp fielen folgende Unterschiede auf: Während die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der mLK gesunder Tiere stets auffallend hohe Konzentrationen an IL-10 erzeugten, schienen die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus Milz und Lamina propria in der IL-10-Produktion nicht ausgeprägt aktiv zu sein. Dass aber auch die humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lamina propria-Zellen gesunder Probanden – selbst nach Stimulation – verhältnismäßig wenig IL-10 produzieren, wurde vor kurzem in der Literatur beschrieben<sup>86</sup>. Ein möglicher Erklärungsversuch ist, dass die T<sub>reg</sub>-Zellen gesunder Probanden in einem inaktiven Zustand verweilen und erst nach Aktivierung größere Mengen an IL-10 sezernieren.

Denning et al.<sup>70</sup> fanden in Versuchen, dass IL-10 für die Suppression einer Colitis nicht unbedingt am Ort der Inflammation – im Falle einer Colitis in den Darmwandabschnitten – vorhanden sein muss. Auch die Stimulation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen und eine starke IL-10-Produktion in mesenterialen Lymphknoten habe ausgereicht, um eine Colitis zu verhindern. Von großer Bedeutung scheint dieses Resultat im Hinblick auf unseren Fund, dass die IL-10-Sekretion in den mLK stets am stärksten ausgeprägt war. In Übereinstimmung damit wurde weiterhin beschrieben, dass aktivierte DCs des Intestinums bevorzugt in mLK wandern, um dort mit T-Zellen in Kontakt zu treten<sup>61</sup>.

Aufgrund der stark schwankenden Angaben für die Funktion und Sekretion in den einzelnen Organen, wird derzeit eine organspezifische Rolle für IL-10 diskutiert<sup>87</sup>.

Eine neue Beobachtung unsererseits war, dass die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus Milz und Lamina propria erkrankter Tiere in-vitro deutlich weniger IL-10 produzierten, während die IL-10 Sekretion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen allerdings zunahm. Insbesondere bei den

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der entzündeten Lamina propria zeigten sich stets sehr niedrige IL-10-Sekretion im Vergleich zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Lymphozyten, die aus gesundem Colon isoliert wurden. Dies ist so bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden, könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, dass ein Teil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen bei chronischer Inflammation als Verstärkung der Immunantwort ebenfalls regulatorisch aktiv wird und durch Sekretion von IL-10 versucht, die Colitis einzudämmen. Seit kurzem wird intensiv nach Untergruppen der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen gesucht, die in Verdacht stehen, regulatorische Aktivität zu übernehmen. Für einen Teil der Milz-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen, auf denen das so genannte kostimulatorische Molekül „programmed death 1“ (PD1) nachgewiesen wurde, konnte gezeigt werden, dass diese – anders als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen – große Mengen an IL-4 und IL-10 produzierten und ihre regulatorische Aktivität größtenteils auf diese Zytokinproduktion zurückzuführen sein dürfte<sup>88</sup>.

Versuche mit Anti-IL-10-Antikörpern in der Kokultur von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen und DCs zeigten wenig Unterschiede im Vergleich zu den Kokulturen ohne Anti-IL-10-Antikörper. Die Vermutung, der Wegfall des wichtigen antiinflammatorischen Interleukin-10 führe zu einer stärkeren Aktivierung der DCs, konnte nicht bestätigt werden. In der Arbeitsgruppe von Thornton<sup>54</sup> wurden ebenfalls Experimente mit Antikörpern, die gegen IL-10 gerichtet waren, durchgeführt. Es zeigte sich, dass die suppressive Wirkung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen durch diese Antikörper nicht unterdrückt werden konnte. Dennoch existieren auch Arbeiten, die Gegenteiliges beschreiben. So konnten Anti-IL-10-Antikörper in einer Kokultur von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen und DCs die Suppression, die ohne Antikörper auf DCs ausgeübt wurde, zum Teil reduzieren<sup>84</sup>.

Die Kontrolle der T-Zell-Aktivierung durch T<sub>reg</sub>-Zellen zeigte sich zumindest in-vitro nicht abhängig von IL-10 und TGF-β<sup>54</sup>. Aus Versuchen mit humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen konnte ebenfalls der Schluss gezogen werden, dass Zytokine für die Suppression anderer T-Effektorzellen nicht zwingend notwendig sind<sup>79, 80</sup>.

Dies könnte einmal mehr ein Hinweis darauf sein, dass die suppressiven Effekte der regulatorischen T-Zellen überwiegend durch Zell-Zell-Kontakte vermittelt werden, wie schon mehrfach diskutiert<sup>35</sup>.

TGF-β scheint auf eine andere Art und Weise die Immunantwort zu modulieren. Zwar konnte gezeigt werden, dass auch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen, die aus TGF-β-defizienten

Mäusen stammten, eine Colitis verhindern konnten; dies gelang jedoch nur in Anwesenheit von TGF- $\beta$  im entzündeten Gewebe <sup>89</sup>.

Interessante Aspekte zeigen Arbeiten zur Funktion von TGF- $\beta$ , in denen durch Ko-Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) auf CD25-negativen tierischen Zellen mit TGF- $\beta$  eine Konversion dieser Zellen in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden konnte <sup>56</sup>.

Bisher konnte beobachtet werden, dass der Einfluss von TGF- $\beta$  auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen zu einer vermehrten foxp3-Expression führte <sup>90</sup>. In der Zwischenzeit konnte in der Transplantationsforschung ergänzend gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  ein kostimulatorischer Faktor für die Expression von foxp3 sein könnte <sup>91</sup>. Für foxp3 konnte gezeigt werden, dass es sowohl auf die Effektorfunktion als auch auf die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen Einfluss nehmen kann <sup>56, 90</sup>. Die Arbeitsgruppe von Chen et al. vermutet aber, dass die Konversion der CD25<sup>-</sup>-Zellen alleine durch TGF- $\beta$  und das Vorhandensein des TCR auf den T-Zellen möglich sein könnte.

Bei Betrachtung der bisherigen Erkenntnisse, stellt sich die Frage, ob die Gründe für das Entwickeln bzw. den Erhalt einer Colitis durch eine reduzierte Zahl regulatorisch aktiver T-Zellen oder durch Funktionsdefekte bei normaler Anzahl dieser Zellen zu suchen sind. Bis vor wenigen Jahren wurde hauptsächlich vermutet, dass eine Dysregulation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen zu CED führt.

In unseren Versuchen konnten wir aus der Lamina propria erkrankter Tiere erheblich mehr CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen als aus der Lamina propria von gesunden Balb/c-Mäusen isolieren. In ihrer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Expression unterschieden sie die Lymphozyten nicht. Die beiden anderen Marker für regulatorische T-Zellen – foxp3 und  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin – wurden hingegen in den Zellen erkrankter Tiere verstärkt exprimiert und in den durchgeführten Kokultur-Experimenten ließen sich sowohl bei Zellen gesunder als auch bei Zellen erkrankter Tiere suppressive Effekte auf die Aktivierung von DCs nachweisen.

Makita et al. zeigten in Versuchen mit humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus der Lamina propria, die aus Darmresektaten von Patienten mit akuter CU oder aktivem MC isoliert wurden, dass die Anzahl der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen bei Entzündung stark zunahm <sup>86</sup>. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Zellen auf weitere regulatorische Charakteristika und führte Kokulturen mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen durch. Die aus erkrankter humaner Lamina



propria isolierten Zellen exprimierten u. a. CD25 und foxp3 und supprimierten in vitro die Sekretion inflammatorischer CD4<sup>+</sup>-Zellen.

Eine weitere Arbeit zur Frage, ob die T-regulatorischen Zellen aus entzündlich veränderten Colonabschnitten funktionell unbeeinträchtigt sind, konnte zeigen, dass mLK-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen suppressiv auf andere T-Zellen wirken und die Konzentration an inflammatorischen Zytokinen in vitro senken <sup>80</sup>.

Andere Untersuchungen peripherer und intestinaler humaner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen <sup>92</sup> führten zu dem Schluss, dass obwohl prozentual gesehen im entzündeten Stadium mehr regulatorische T-Zellen in der Lamina propria zu finden waren, ein relativer Mangel an diesen Zellen wahrscheinlich ist. In diesen Versuchen wurde die Anzahl der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen gesunder Probanden bzw. an aktiver CED oder an inaktiver CED-Erkrankter sowie bei akuter Divertikulitis verglichen. Dabei zeigte sich, dass im Stadium der aktiven CED nur wenige CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripherem Blut der Patienten isoliert werden konnten, während in der Lamina propria verhältnismäßig viele T-Zellen CD25 und FOXP3 exprimierten. Durch eine Umverteilung der suppressiv wirkenden Zellen ließe sich der Mangel an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen im Blut erklären, aber die Autoren geben einschränkend zu bedenken, dass bei einer Divertikulitis sowohl in der Lamina propria als auch im peripheren Blut mehr CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden konnten. Die Autoren gehen daher eher von einem numerischen Defekt der regulatorischen T-Zellen bei CED aus, da auch sie in ihren Kokulturen mit Blut-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der an CED erkrankten Patienten suppressive Effekte auf die Proliferationsraten von CD25<sup>-</sup>-T-Zellen verzeichnen konnten.

Zusammenfassend legen alle diese Ergebnisse nahe, dass die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen der erkrankten Lamina propria und der die Darmwand drainierenden mLK funktionsfähig sein könnten. Das Vorhandensein der T<sub>reg</sub>-Lymphozyten dürfte demnach vermutlich eher protektiv als pathogen sein. Makita et al. äußerten die Vermutung, dass eine verstärkte Repräsentation von CD80, CD86 und eine höhere Konzentration an inflammatorischen Zytokinen wie IL-2, IL-6 die regulatorische Funktion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen stören könnte. Diese These wird durch erste Arbeiten untermauert, die nachweisen konnten, dass Interleukin-6, das von aktivierten DCs produziert wurde, die regulatorische Aktivität von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen blockiert <sup>93</sup>. Ähnlich konnte in

voneinander unabhängigen Arbeiten mehrfach eine reversible Reduktion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen durch hohe Dosen von Interleukin-2 aufgezeigt werden<sup>54, 94</sup>.

Obwohl weiter oben diskutiert wurde, dass IL-10 in der Interaktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen gesunder Tiere und DCs eine geringere Rolle als bisher angenommen spielen könnten, ist bei den eigenen Ergebnissen auffallend, dass insbesondere die IL-10-Sekretion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen der Lamina propria erkrankter Tiere gegenüber denen gesunder Tiere deutlich abnahm. IL-10 könnte für die APC der Lamina propria erkrankter Tiere eine weitaus wichtigere Rolle spielen als bisher angenommen. Der Mangel an IL-10 könnte einen Teil dazu beitragen, eine Colitis auszulösen bzw. zu verstärken. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass durch die Gabe von IL-10 im Maus-Transfer-Modell die Entwicklung einer Colitis bei SCID-Mäusen verhindert werden konnte und es bei Beendigung der IL-10-Gabe rasch zur Entwicklung einer Colitis kam<sup>67</sup>. Unter Berücksichtigung dieser Befunde ergeben sich im Gegensatz zu vorherig Diskutiertem doch gewisse Hinweise auf eine partielle Dysfunktion der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass nach derzeitigem Wissensstand unklar bleibt, warum die größere Anzahl von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen in der Lamina propria erkrankter Tiere keine klinisch messbare anti-inflammatorische Wirkung erzielen kann. Ob unter der größeren Anzahl mehr Zellen mit Funktionsdefekten sind, kann trotz Erfüllung der Kriterien für regulatorische T-Zellen (CD25<sup>+</sup>, foxp3 und  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin) nicht sicher ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit tierischen Zellen experimentiert. Daher stellt sich die Frage, inwieweit die hier aufgezeigten Ergebnisse auf den menschlichen Organismus übertragbar sind. Zusätzlich soll im folgenden Abschnitt erörtert werden, welche bisherigen Erkenntnisse existieren, dass die in vitro beobachteten Effekte auch in-vivo ablaufen.

Regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen konnten auch aus humanem Thymus und peripherem Blut isoliert werden und zeigten in-vitro ebenfalls immunsuppressive Effekte auf T-Zellen<sup>95</sup>. Regulatorische T-Zellen finden sich unabhängig von CED auch

bei gesunden Menschen. Auch das *foxp3*-Gen, das eine tragende Rolle bei der Funktion der regulatorischen T-Zellen spielt, wurde in humanen  $CD4^+CD25^+$ -Zellen als FOXP3 nachgewiesen und die Wichtigkeit seiner Funktion in humanen  $CD4^+CD25^+$ -Zellen bestätigt <sup>79</sup>.

Im Jahre 2004 gelang es Makita et al. <sup>86</sup>  $CD4^+CD25^+$ -regulatorische T-Zellen aus humaner Lamina propria zu isolieren und zu zeigen, dass diese Zellen wichtige Regulatoren des intestinalen Immunsystems sind. Die Forscher fanden, dass ca. 6% der  $CD4^+$ -Lymphozyten für CD25 positiv waren. Sie führten weitergehende Untersuchungen mit humanen Darmzellen durch, die von Patienten stammten, bei denen zum Zeitpunkt der Colonsegmentresektion makros- und mikroskopisch ein akuter Schub einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung vorlag. Dabei konnten aus diesen entzündlich veränderten Resektaten eine deutlich erhöhte Anzahl an  $CD4^+CD25^+$ -Zellen isolieren. Unsere Experimente mit Vergleichen zwischen  $CD4^+CD25^+$ -Lamina propria-Zellen von gesunden und an Colitis erkrankten Mäusen zeigten – wie bereits erwähnt – ebenfalls eine Zunahme der Anzahl an  $CD4^+CD25^+$ -Zellen in der Lamina propria erkrankter Tiere. Inzwischen gelang es einer weiteren Arbeitsgruppe,  $CD4^+CD25^+$ -Zellen aus der Colonmukosa von Morbus Crohn-Patienten zu isolieren <sup>77</sup> und diese in vitro zu expandieren. Im Jahre 2007 wurde publiziert, dass entzündete Darmabschnitte von CU-Patienten mehr FOXP3<sup>+</sup> $CD4^+CD25^+$ -Zellen aufwiesen <sup>80</sup>. Die Arbeitsgruppe von Yu et al. fand insgesamt auch in Arealen, die makroskopisch keine Hinweise auf eine Inflammation boten, mehr FOXP3<sup>+</sup> $CD4^+$ -Zellen im Colon dieser Patienten.

Was die Funktion der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen anbelangt, könnte für humane  $CD4^+CD25^+$ -Zellen ähnliches gelten wie für die tierischen Zellen:  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen der Lamina propria konnten in Kokulturen mit APC  $CD4^+CD25^-$ -Zellen aus dem peripheren Blut in ihrer Proliferationsrate hemmen. Dies gelang auch mit  $CD4^+CD25^+$ -Zellen aus erkrankter Lamina propria, während die  $CD4^+CD25^-$ -Lamina propria Zellen in Kokultur-Experimenten keine regulatorische Aktivität zeigten <sup>86</sup>. Im Unterschied zu unseren Arbeiten, verwendete die Arbeitsgruppe von Makita  $CD4^-$ -Zellen als APC, die stets zusätzlich zu den  $CD4^+CD25^-$ -Zellen in Kultur gebracht wurden, während wir nur mit BM-DCs arbeiteten.

Yu et al. <sup>80</sup> führten ihre Kokultur-Experimente mit humanen mLK- $CD4^+CD25^+$ ,  $CD4^+CD25^-$  und APC durch und konnten ebenfalls eine Suppression der Proliferationsrate der  $CD25^-$ -Zellen feststellen. In Kokulturen, in denen nur DCs als APC eingesetzt wurden, konnte nach Inkubation mit mLK- $CD4^+CD25^+$ - und

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen in den Überständen gegenüber denen der Kokulturen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen und DCs eine deutliche Reduktion einiger inflammatorischer Zytokine beschrieben werden <sup>80</sup>.

Mirsa et al. publizierten Daten, wonach humane CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-regulatorische T-Zellen in der Lage waren, die Maturation und antigen-präsentierende Funktion der DCs abzuschwächen <sup>96</sup>. Die Forschergruppe konnte diese Beobachtung durch Kokulturen von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen aus peripherem Blut und DCs, die durch Stimulation von Blut-Monozyten kultiviert wurden, darlegen. Es zeigt sich u. a. eine signifikante Reduktion von CD86 und CD40 bei DCs, die mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen in Kontakt standen. Dieser Effekt konnte bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-Zellen hingegen nicht beobachtet werden. Besonders bemerkenswert erscheinen auch Transwell-Versuche dieser Arbeitsgruppe, die zeigen, dass die Suppression der DCs nur bei Zell-Zell-Kontakt mit den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen zu verzeichnen war. Diese Daten stützen unsere Vermutung, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen am ehesten durch direkten Zellkontakt in der Lage sind, DCs in ihrer Aktivität zu regulieren.

Auch eine kürzlich publizierte Arbeit zur Untersuchung der Interaktion von T<sub>reg</sub>-Zellen und DCs aus peripherem humanen Blut konnte die durch T<sub>reg</sub>-Zellen schon einige Male zuvor beschriebene Suppression der DCs bestätigen <sup>85</sup>. Die ko-stimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 wurden in Kokulturen mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen am stärksten supprimiert. Im Unterschied zu unseren Versuchen führte diese Arbeitsgruppe ihre Versuche mit humanen Zellen, die sie aus peripherem Blut isolierten, durch. Die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen wurden vor Einsatz in der Kokultur zunächst 24 h mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert und dann im Verhältnis 1 : 5 zu den DCs eingesetzt. Hierdurch könnte sich erklären lassen, warum die Forscher eine sehr stark suppressive Wirkung der T<sub>reg</sub> verzeichnen konnten, die unter der Basis-Expression der DCs lag. Hervorzuheben ist jedoch, dass humane T<sub>reg</sub> – ebenso wie die von uns untersuchten Maus-CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen – in der Lage zu sein scheinen, DCs in ihrer Aktivität herunter zu regulieren.

Schlussfolgernd kann zusammengefasst werden, dass in vivo-Experimente, die nach Modellen der in vitro-Versuche konzipiert wurden, überwiegend die vermuteten Ergebnisse zeigten, so dass sich einige Anhaltspunkte dafür ergeben, dass das Zusammenspiel von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen und DCs in vivo – mit gewissen Einschränkungen – ähnlich ablaufen könnte.

Wie bereits ausgeführt, konnten  $CD4^+CD25^+$ -Zellen, die regulatorische Aktivität zeigten, aus humanem Darm isoliert werden<sup>86, 97</sup>. Wenn es möglich wäre, diese Zellen zu vervielfältigen, könnte über eine in-vivo Therapie mit regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit CED in Erwägung gezogen werden. Lange Zeit wurde die geringe Proliferationsrate der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen als limitierender Faktor für eine mögliche therapeutische Verabreichung von regulatorischen T-Zellen gesehen. Nun ist es aber gelungen, humane  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen aus peripherem Blut mit Stimulation von anti-CD3 und anti-CD28 sowie hohen Konzentrationen an IL-2 in vitro zu vervielfachen<sup>98</sup>. Obwohl bei einzelner experimenteller Verabreichung von T-Lymphozyten an gesunde Testpersonen keine Nebenwirkungen verzeichnet wurden<sup>99</sup>, sollte dies nicht zu schnell verallgemeinert werden. Zu groß ist derzeit noch der Unsicherheitsfaktor, wie die in-vitro-expandierten regulatorischen T-Zellen mit dem menschlichen Organismus interagieren würden.

Dennoch besteht die Hoffnung, dass der Nutzen von  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen bei CED eines Tages bei der Therapie von CED zum Tragen kommen könnte.

Die eigenen Ergebnisse sollten einen Beitrag dazu liefern, genauere Erkenntnisse über die Ausprägung, die Funktion und Zell-Interaktion der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen zu erlangen und eventuell vorhandene Unterschiede zwischen  $T_{reg}$ -Zellen gesunder Mäuse und  $T_{reg}$ -Zellen erkrankter Colitismäuse aufzuzeigen, um das Verhalten dieser Zellen in-vivo zu verstehen.

## 5 Zusammenfassung

Die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist ein sehr aktuelles Thema in der medizinischen Forschung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von  $CD4^+CD25^+$ -regulatorischen T-Zellen auf dendritische Zellen bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Im experimentellen Teil der Arbeit wurde an gesunden Balb/c-Mäusen das Vorkommen von  $CD4^+CD25^+$ -Zellen in Milz, mesenterialen Lymphknoten und in der Lamina propria durch Isolation mithilfe magnetischer Beads und FACS-Analyse bewiesen.

In einem zweiten Schritt wurde ihre regulatorische Aktivität auf knochenmarksgenerierte dendritische Zellen (DCs) durch Kokulturen über 70 Stunden näher untersucht. Um ein besseres Verständnis für die Rolle der  $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu erlangen, wurde derselbe Versuchsaufbau auf die T-Zellen erkrankter Mäuse angewendet. Dazu dienten SCID-Mäuse, die 6 bis 8 Wochen nach Injektion von  $CD4^+CD62L^+$ -Zellen eine ausgeprägte Colitis entwickelten.

Bei der Charakterisierung der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen ergab sich, dass diese in allen untersuchten Gewebearten vorkommen. Während bei gesunden Tieren die Anzahl regulatorischer Zellen in Milz und mesenterialen Lymphknoten wesentlich höher ist als in der Lamina propria, ändert sich dieses Verhältnis bei der Betrachtung erkrankter Tiere. In der Lamina propria an Colitis erkrankter Mäuse nimmt der Anteil an  $CD4^+CD25^+$ -Zellen deutlich zu. Durch Auswertungen des quantitativen Vorkommens von foxp3 und  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf  $CD4^+CD25^+$ -Zellen konnte gezeigt werden, dass die  $CD4^+CD25^+$ -Zellen der erkrankten Tiere stärker aktiviert sind als bei gesunden Tieren.

In Kokulturen mit dendritischen Zellen konnten anhand der verminderten Expression der Oberflächenmarker CD40, CD80, CD86 und der verminderten Freisetzung von IL-12 durch DCs die suppressiven Eigenschaften der regulatorischen  $CD4^+CD25^+$ -Zellen aufgezeigt werden. Hierbei zeigte sich sowohl bei den Zellen gesunder Tiere als auch bei den Zellen erkrankter Tiere ein deutlich suppressiver Effekt der  $CD4^+CD25^+$ -Zellen auf die dendritischen Zellen gegenüber der Kokultur mit  $CD4^+CD25^-$ -Zellen und DCs. Die zentrale Arbeitshypothese, dass regulatorische  $CD4^+CD25^+$ -Zellen

immunoregulativ auf antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen wirken, konnte damit eindeutig bestätigt werden.

Interessanterweise ließ sich eine hohe  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin-Expression von CD25<sup>-</sup>-T-Zellen aus mLK und Lamina propria von an Colitis erkrankten Tieren messen, während bei CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen, die aus gesunden Tieren isoliert wurden, keine erhöhte  $\alpha_E\beta_7$ -Integrin-Expression nachgewiesen werden konnte. Dies wirft die weitergehende Frage auf, ob auch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-T-Zellen bei starker Inflammation in einem Gewebe ebenfalls – möglicherweise in geringerem Ausmaß oder gerade durch vorherigen Kontakt mit den CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen – regulative Einflüsse ausüben können.

Unklar bleibt auch, warum in erkrankter Lamina propria solch hohe Anzahlen an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen, die zwar wie gezeigt immunsuppressiv wirken, aber die Entzündung nicht vollständig eindämmen können, gefunden wurden. Besteht dennoch ein relativer Mangel an diesen Zellen oder handelt es sich um einen Funktionsverlust der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Zellen erkrankter Tiere? Um dies zu klären, wäre eine genaue Analyse der Funktionsfähigkeit der untersuchten Zellen notwendig.

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise darauf, dass eine Verabreichung von T-Lymphozyten ohne gravierende Nebenwirkungen für den menschlichen Organismus einhergeht. Somit wäre die Grundlage für eine Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen gegeben. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag dazu liefern, das Verhalten von regulatorischen Zellen in-vitro und in-vivo besser zu verstehen und damit neue Wege für immunmodulatorische Therapien aufzuzeigen. Die Frage, ob ein derartiger Therapieversuch in Zukunft zum Einsatz kommen kann, bleibt vorerst offen. Es sind weitere in-vitro und in-vivo Versuche mit humanem Material notwendig, um dies zu beantworten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Timmer A. Epidemiologie der CED. In: Hoffmann J, editor. Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen: Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis. 1 ed. Stuttgart, New York: Thieme Verlag; 2004:8-19.
2. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39(5):690-697.
3. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379(6568):821-823.
4. Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK et al. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 1996;5(10):1679-1683.
5. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):599-603.
6. van Heel DA, McGovern DP, Jewell DP. Crohn's disease: genetic susceptibility, bacteria, and innate immunity. *Lancet* 2001;357(9272):1902-1904.
7. Cho JH. Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. *Rev Gastroenterol Disord* 2003;3 Suppl 1:S18-S22.
8. Rogler G. Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20(4):311-317.
9. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S et al. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* 2006;41(12):1421-1432.
10. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002;359(9318):1661-1665.
11. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123(3):679-688.
12. Elliott DE, Li J, Blum A et al. Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(3):G385-G391.
13. Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 1988;29(3):352-357.



14. Madretsma S, Wolters LM, van Dijk JP et al. In-vivo effect of nicotine on cytokine production by human non-adherent mononuclear cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8(10):1017-1020.
15. Theis MK, Boyko EJ. Patient perceptions of causes of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1994;89(10):1920.
16. Lodes MJ, Cong Y, Elson CO et al. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 2004;113(9):1296-1306.
17. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS et al. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996;98(4):945-953.
18. Cahill RJ, Foltz CJ, Fox JG, Dangler CA, Powrie F, Schauer DB. Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun* 1997;65(8):3126-3131.
19. Strauch UG, Obermeier F, Grunwald N et al. Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. *Gut* 2005;54(11):1546-1552.
20. Obermeier F, Dunger N, Strauch UG et al. CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005;129(3):913-927.
21. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995;102(3):448-455.
22. Schultz M, Strauch UG, Linde HJ et al. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11(2):372-378.
23. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004;53(11):1617-1623.
24. Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11(5):853-858.
25. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354(9179):635-639.
26. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347(12):911-920.
27. Choy MY, Walker-Smith JA, Williams CB, MacDonald TT. Differential expression of CD25 (interleukin-2 receptor) on lamina propria T cells and

- macrophages in the intestinal lesions in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1990;31(12):1365-1370.
28. Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;170(8):3939-3943.
  29. Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY. CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. *J Immunol* 2003;171(10):5012-5017.
  30. Denning TL, Qi H, Konig R, Scott KG, Naganuma M, Ernst PB. CD4+ Th cells resembling regulatory T cells that inhibit chronic colitis differentiate in the absence of interactions between CD4 and class II MHC. *J Immunol* 2003;171(5):2279-2286.
  31. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2(6):389-400.
  32. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6(4):345-352.
  33. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999;163(10):5211-5218.
  34. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3(3):253-257.
  35. Singh B, Read S, Asseman C et al. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 2001;182:190-200.
  36. Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000;192(2):295-302.
  37. Heller F, Duchmann R. Intestinal flora and mucosal immune responses. *Int J Med Microbiol* 2003;293(1):77-86.
  38. Watanabe K, Rao VP, Poutahidis T et al. Cytotoxic-T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade abrogates protection by regulatory T cells in a mouse model of microbially induced innate immune-driven colitis. *Infect Immun* 2008;76(12):5834-5842.
  39. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299(5609):1057-1061.
  40. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27(1):20-21.
  41. Godfrey VL, Wilkinson JE, Russell LB. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol* 1991;138(6):1379-1387.

42. Ramsdell F, Ziegler SF. Transcription factors in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2003;15(6):718-724.
43. Powrie F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1029:132-141.
44. Blair PJ, Bultman SJ, Haas JC, Rouse BT, Wilkinson JE, Godfrey VL. CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J Immunol* 1994;153(8):3764-3774.
45. Kilshaw PJ, Murant SJ. Expression and regulation of beta 7(beta p) integrins on mouse lymphocytes: relevance to the mucosal immune system. *Eur J Immunol* 1991;21(10):2591-2597.
46. Andrew DP, Rott LS, Kilshaw PJ, Butcher EC. Distribution of alpha 4 beta 7 and alpha E beta 7 integrins on thymocytes, intestinal epithelial lymphocytes and peripheral lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996;26(4):897-905.
47. Hermiston ML, Gordon JI. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1995;129(2):489-506.
48. Cepek KL, Shaw SK, Parker CM et al. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 1994;372(6502):190-193.
49. Bargatze RF, Jutila MA, Butcher EC. Distinct roles of L-selectin and integrins alpha 4 beta 7 and LFA-1 in lymphocyte homing to Peyer's patch-HEV in situ: the multistep model confirmed and refined. *Immunity* 1995;3(1):99-108.
50. Schon MP, Arya A, Murphy EA et al. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol* 1999;162(11):6641-6649.
51. Annacker O, Coombes JL, Malmstrom V et al. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* 2005;202(8):1051-1061.
52. Rogler G, Andus T. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998;22(4):382-389.
53. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75(2):263-274.
54. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998;188(2):287-296.
55. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001;2(9):816-822.
56. Chen W, Jin W, Hardegen N et al. Conversion of peripheral CD4+. *J Exp Med* 2003;198(12):1875-1886.

57. Kehrl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 1986;137(12):3855-3860.
58. Shull MM, Ormsby I, Kier AB et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359(6397):693-699.
59. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(6673):245-252.
60. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 1995;154(10):5071-5079.
61. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004;303(5664):1662-1665.
62. Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur J Immunol* 1996;26(4):934-938.
63. Rath HC, Schultz M, Freitag R et al. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 2001;69(4):2277-2285.
64. Malmstrom V, Shipton D, Singh B et al. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol* 2001;166(11):6972-6981.
65. Krajina T, Leithauser F, Moller P, Trobonjaca Z, Reimann J. Colonic lamina propria dendritic cells in mice with CD4+ T cell-induced colitis. *Eur J Immunol* 2003;33(4):1073-1083.
66. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Caddle LB, Coffman RL. Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 1993;5(11):1461-1471.
67. Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1994;1(7):553-562.
68. Mudter J, Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L+ CD4+ T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis. *Pathobiology* 2002;70(3):170-176.
69. Makita S, Kanai T, Nemoto Y et al. Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J Immunol* 2007;178(8):4937-4946.

70. Denning TL, Kim G, Kronenberg M. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells impaired for intestinal homing can prevent colitis. *J Immunol* 2005;174(12):7487-7491.
71. Lehmann J, Huehn J, de la RM et al. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(20):13031-13036.
72. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol* 2001;166(5):3008-3018.
73. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;192(9):1213-1222.
74. Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 2002;196(2):247-253.
75. Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC et al. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2004;199(3):303-313.
76. Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. FOXP3+ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol* 2006;36(11):2832-2836.
77. Kelsen J, Agnholt J, Hoffmann HJ, Romer JL, Hvas CL, Dahlerup JF. FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties can be cultured from colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 2005;141(3):549-557.
78. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005;6(12):1219-1227.
79. Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J Clin Invest* 2003;112(9):1437-1443.
80. Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(2):191-199.
81. Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30(6):1538-1543.
82. Park HB, Paik DJ, Jang E, Hong S, Youn J. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor-beta-costimulated CD4+. *Int Immunol* 2004;16(8):1203-1213.

83. Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2004;6(8):745-751.
84. Larmonier N, Marron M, Zeng Y et al. Tumor-derived CD4(+)CD25(+) regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56(1):48-59.
85. Bayry J, Triebel F, Kaveri SV, Tough DF. Human dendritic cells acquire a semimature phenotype and lymph node homing potential through interaction with CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;178(7):4184-4193.
86. Makita S, Kanai T, Oshima S et al. CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol* 2004;173(5):3119-3130.
87. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2006;212:256-271.
88. Totsuka T, Kanai T, Makita S et al. Regulation of murine chronic colitis by CD4+. *Eur J Immunol* 2005;35(6):1773-1785.
89. Fahlen L, Read S, Gorelik L et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2005;201(5):737-746.
90. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+. *J Immunol* 2004;172(9):5149-5153.
91. Cobbold SP, Castejon R, Adams E et al. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004;172(10):6003-6010.
92. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;128(7):1868-1878.
93. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003;299(5609):1033-1036.
94. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 1999;162(9):5317-5326.
95. Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 2001;31(4):1247-1254.
96. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004;172(8):4676-4680.

- 
97. Fleck M, Hoves S, Vogl D et al. CD4+CD25+ Regulatory T-Cells in Human Colonic Mucosa: Isolation and Functional Charakterisation. 2004.  
Ref Type: Unpublished Work
98. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004;104(3):895-903.
99. Kelsen J, Agnholt J, Falborg L et al. Indium-labelled human gut-derived T cells from healthy subjects with strong in vitro adhesion to MAdCAM-1 show no detectable homing to the gut in vivo. *Clin Exp Immunol* 2004;138(1):66-74.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zellen
Balb	Bagg Albino Maus
(BM-)DC	(bone marrow) dendritic cells
Bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
d	die =Tag
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
Exp	Experiment
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Flourescein-Isothiozyanat
Foxp3	forkhead box proteine
GMZ	Gesamtmilzzellen
h	hora = Stunde
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LASER	light amplification by stimulated emission of radiation
LpL	Lamina propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
mLK	mesenteriale Lymphknoten
n.u.	nicht untersucht
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerithrin
rpm	rates per minute
SCID	severe combined immunodeficiency
TCR	T-Zell-Rezeptor



---

T <sub>reg</sub>	regulatorischer T-Lymphozyt
V	Volt

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Das SCID-Transfer Modell: Übersicht über die Entwicklung einer chronischen Colitis nach Transfer verschiedener Zellpopulationen in SCID-Mäuse. (Abbildung übernommen aus Ethan M. Shevach CD4+CD25+ Suppressor T Cells, Nature Review <sup>31</sup> , IBD = inflammatory bowel disease entspricht dem Begriff CED) .....	6
Abbildung 1.2 entnommen aus Löffler/Petrides, Biochemie und Pathobiochemie S. 769, 7. Auflage, Springer-Verlag, Aufbau eines Integrins aus $\alpha$ - und $\beta$ -Untereinheit, das mit Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM) in Kontakt steht und mit seiner intrazellulären Domäne mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung steht und spezifische Proteinkinasen aktivieren kann.....	10
Abbildung 1.3 Illustration der beschriebenen Marker und Zytokine von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-Zellen.....	11
Abbildung 1.4 Elektronenmikroskopische Abbildung einer dendritische Zelle und eines Lymphozyten, Departement of Pathology, University of South California.....	13
Abbildung 2.1 Schematische Abbildung der Verteilung der einzelnen Zellen aufgrund ihrer Dichte nach Zentrifugation der Zellsuspension im Percoll <sup>TM</sup> -Dichtegradient .....	25
Abbildung 2.2 Beispiel für die Plattenbelegung der Kokultur in einer 48er Well-Platte .....	27
Abbildung 2.3 Schematischer Aufbau und Funktionsweise eines Durchflusszytometers .....	29
Abbildung 2.4 Schematische Darstellung eines beliebigen Dotplots nach Größe und Granularität sortiert .....	30
Abbildung 3.1 Gesamtmilzzellen von gesunden Tieren im Forward und Side-Scatter, Gate liegt auf Lymphozyten.....	40
Abbildung 3.2 T-Lymphozyten von gesunden.....	40
Abbildung 3.3 Gesamtmilzzellen von erkrankten Tieren im Forward und Side-Scatter .....	41
Abbildung 3.4 T-Lymphozyten von gesunden Tieren im CD4-FITC und CD25-PE markiert .....	41
Abbildung 3.5 Gesamtzellen aus mesenterialen Lymphknoten gesunder Tiere im Forward und Side-Scatter, Gate liegt auf Lymphozyten.....	41
Abbildung 3.6 gegatete mesenteriale Lymphozyten gesunder Tiere, CD4-FITC und CD25-PE markiert.....	41
Abbildung 3.7 Gesamtzellen aus den mesenterialen Lymphknoten von Transfer-mäusen mit Colitis im Forward und Side-Scatter, Gate liegt auf Lymphozyten.....	42

Abbildung 3.8	gegatete mesenteriale Lymphozyten von Transfermäusen mit Colitis, CD4-FITC und CD25-PE markiert.....	42
Abbildung 3.9	Gesamtmilzzellen von Transfermäusen mit Colitis im Forward und Side-Scatter, Gate liegt auf Lymphozyten .....	42
Abbildung 3.10	gegatete Milz-Lymphozyten .....	42
Abbildung 3.11	Gesamtzellen aus der Lamina propria gesunder Tiere im Forward und Side-Scatter, Gate liegt auf Lymphozyten .....	43
Abbildung 3.12	gegatete Lamina propria-Lymphozyten gesunder Tiere, CD4-FITC und CD25-PE markiert .....	43
Abbildung 3.13	Gesamtzellen aus der Lamina propria von Transfer-mäusen mit Colitis im Forward und Side-Scatter .....	43
Abbildung 3.14	gegatete Lymphozyten aus der Lamina propria von Transfermäusen mit Colitis, CD4-FITC und CD25-PE markiert .....	43
Abbildung 3.15	Charakterisierung der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -Milzzellen, die aus gesunden und kranken Tiere isoliert wurden, hinsichtlich ihrer CD4- und CD25-Expression.....	45
Abbildung 3.16	Charakterisierung der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -Zellen, die aus mesenterialen Lymphknoten gesunden und kranken Tiere isoliert wurden, hinsichtlich ihrer CD4- und CD25-Expression.....	46
Abbildung 3.17	Charakterisierung der CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -Zellen, die aus Lamina propria gesunden und kranken Tiere isoliert wurden, hinsichtlich ihrer CD4- und CD25-Expression.....	47
Abbildung 3.18	Übersicht des Vorkommens von $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf Milz-T-Lymphozyten anhand von FACS-Oberflächenfärbung .....	49
Abbildung 3.19	Übersicht über das Vorkommen von $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf mLK-T-Lymphozyten anhand von FACS-Oberflächenfärbungen .....	50
Abbildung 3.20	Übersicht über das Vorkommen von $\alpha_E\beta_7$ -Integrin auf Lamina propria-T-Lymphozyten anhand von FACS-Oberflächenfärbungen.....	51
Abbildung 3.21	Ausschnitte der Agarose-Gele nach Durchführung der PCR für foxp3 und $\beta$ -Aktin; Einsatz von cDNA von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -Zellen, die aus der Milz und mLK gesunder Mäuse isoliert wurden.....	54
Abbildung 3.22	Übersicht über den foxp3-Nachweis bei CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -Milzzellen gesunder und kranker Tiere .....	55

Abbildung 3.23 Übersicht über den foxp3-Nachweis bei CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -mLK-Zellen gesunder und kranker Tiere .....	56
Abbildung 3.24 Übersicht über den foxp3-Nachweis bei CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -Lamina propria-Zellen gesunder und kranker Tiere .....	57
Abbildung 3.25 Als Boxplot veranschaulichte IL-10 Sekretion von GMZ, CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Zellen der Milz a) gesunder Tiere b) erkrankter Tiere nach 24stündiger Stimulation mit anti-CD3 und IL-2 .....	62
Abbildung 3.26 Als Boxplot veranschaulichte IL-10 Sekretion von Gesamtzellen, CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Zellen der MLK a) gesunder Tiere b) erkrankter Tiere nach 24stündiger Stimulation mit anti-CD3 und IL-2 .....	62
Abbildung 3.27 Als Boxplot veranschaulichte IL-10 Sekretion von Gesamtzellen, CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Zellen der Lamina propria a) gesunder Tiere b) erkrankter Tiere nach 24stündiger Stimulation mit anti-CD3 und IL-2.....	63
3.28 Darstellung der CD40-, CD80- und CD86-Expression unstimulierter DCs der Milz-Kokultur als Histogramme nach FITC-markierter Färbung und FACS Analyse des 1. Exp. ....	65
Abbildung 3.29 Darstellung der Expression von CD40, CD80 und CD86 von unstimulierten DCs, die mit CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> - oder CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Lp-Zellen gesunder Balb/c-Tiere inkubiert wurden .....	69
Abbildung 3.30 Histogramme zur Darstellung der IL-12-FACS-Färbung mit unterlegter Kontrolle.....	75

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Übersicht über die für die FACS-Messungen verwendeten Antikörper.....	18
Tabelle 2.2 Zusammensetzung des Miltenyi Biotec CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Isolierungs-Kits.....	19
Tabelle 2.3 Übersicht über die verwendeten Antikörper für die CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> -Isolierung.....	20
Tabelle 2.4 Übersicht der Oberflächen-FACS-Färbung der Kokultur; Kontroll- Färbungen nur von DCs unstimuliert oder CpG stimuliert und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> -Zellen & DCs unstimuliert .....	28
Tabelle 2.5 Übersicht der intrazellulären FACS-Färbungen der Kokultur („*“ bedeutet intrazelluläre Markierung) .....	28
Tabelle 2.6 Herstellen einer Verdünnungsreihe mit Standard und TE-Puffer.....	33
Tabelle 2.7: FACS-Färbung der CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> -Zellen und der CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> -Zellen .....	37
Tabelle 2.8: Herstellung der Verdünnungsreihen für die Luminex-Standards .....	38
Tabelle 3.1: Zusammenfassende Übersicht über die gemittelte Expression von CD4 und CD25 der jeweiligen Zellen in Prozent mit Angabe der Streuung in Klammern .....	44
Tabelle 3.2 Prozentsatz der CD25 <sup>+</sup> exprimierenden Zellen gesunder Tiere in den verschiedenen Zellpräparationen der einzelnen Experimente .....	47
Tabelle 3.3 Prozentsatz der CD25 <sup>+</sup> exprimierenden Zellen erkrankter Tiere in den verschiedenen Zellpräparationen der einzelnen Experimente .....	48
Tabelle 3.4 α <sub>E</sub> β <sub>7</sub> -Integrin-Expression (in Prozent) der untersuchten Zellen gesunder Tiere in den einzelnen Experimenten .....	52
Tabelle 3.5 α <sub>E</sub> β <sub>7</sub> -Integrin-Expression der untersuchten Zellen erkrankter Tiere in den einzelnen Experimenten.....	52
Tabelle 3.6: foxp3-Expression der untersuchten Zellen gesunder Tiere in den einzelnen Experimenten .....	57
Tabelle 3.7 foxp3-Expression der untersuchten Zellen erkrankter Tiere in den einzelnen Experimenten .....	58
Tabelle 3.8 Übersicht der gemessenen Interleukin 10-Expressionen in den einzelnen Experimenten .....	59
Tabelle 3.9 Übersicht der Expression von MHC II, CD40, CD80 und CD86 auf DCs aus der Kokultur mit CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Zellen isoliert von der Milz gesunder Tiere.....	66

Tabelle 3.10 Übersicht der Expression von MHC II, CD40, CD80 und CD86 auf DCs aus Kokulturen mit CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Zellen aus Milzen erkrankter Tiere .....	67
Tabelle 3.11 Aktivierung der DCs nach 70h Kokultur mit CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> bzw. CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Lymphozyten aus Lamina propria gesunder Balb/c-Mäuse .....	70
Tabelle 3.12 Übersicht der Expression von MHC II, CD40, CD80 und CD86 auf DCs aus Kokulturen mit CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Zellen aus der Lamina propria erkrankter Tiere .....	71
Tabelle 3.13 Intrazytoplasmatische Bestimmung der IL-12-Sekretion nach 70 h Kokultur mit Milz-Zellen gesunder Balb/c-Mäuse (Zellen 8 h vor Färbung mit Golgi Plaque behandelt) .....	73
Tabelle 3.14 Intrazytoplasmatische Bestimmung der IL-12-Sekretion nach 70 h Kokultur mit Lamina propria-Zellen gesunder Balb/c-Mäuse (Zellen 8 h vor Färbung mit Golgi Plaque behandelt) .....	73
Tabelle 3.15: Intrazytoplasmatische Bestimmung der IL-12-Sekretion nach 70 h Kokultur mit Milz-Zellen erkrankter SCID-Mäuse (Zellen 8 h vor Färbung mit Golgi Plaque behandelt) .....	74
Tabelle 3.16: Intrazytoplasmatische Bestimmung der IL-12-Sekretion nach 70 h Kokultur mit Lamina propria-Zellen erkrankter SCID-Mäuse (Zellen 8 h vor Färbung mit Golgi Plaque behandelt) .....	74
Tabelle 3.17 Messung der Aktivierung von CpG stim. DCs und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> bzw. CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Lamina propria Zellen im Vergleich bei Zugabe von 20 µg/ml Anti- Interleukin-10-Antikörper zur Kokultur und ohne Zusatz .....	76
Tabelle 3.18 Messung der Aktivierung von CpG stim. DCs und CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> bzw. CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> -Lamina propria-Zellen aus erkrankten SCID-Tieren im Vergleich bei Zugabe von 20 µg/ml Anti-Interleukin zur Kokultur und ohne Zusatz .....	77

## **10 Danksagung**

Herrn Professor Dr. med. Jürgen Schölmerich danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik durchführen zu dürfen.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler für die interessante Themenstellung, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die vielen wertvollen Anregungen.

Ganz spezieller Dank geht an meine Betreuerin Frau Dr. med. Ulrike Strauch für die sehr kompetente Betreuung und die unermüdliche Hilfestellung in allen Phasen der Arbeit. Auch danke ich für die vielen unterstützenden Ratschläge während des Studiums in Regensburg.

Des Weiteren möchte ich den medizinisch technischen Assistentinnen Frau Nicole Grunwald und Frau Nadja Dunger herzlich danken, die mich in viele Arbeitstechniken eingewiesen haben und mir bei vielen langen Versuchen tatkräftig zur Seite standen.

Ich danke allen Arbeitsgruppen der Medizinischen Klinik I der Universität Regensburg für die freundliche Aufnahme in ihre Mitte und die große Hilfsbereitschaft, die ich erfahren durfte.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern danke ich für die stetige Unterstützung und Motivation.

## 11 Lebenslauf

Anna Caroline Patricia Pallauf

geb. am 30.12.1981 in Gießen

ledig, drei Geschwister

Adresse:

Anna Pallauf

Wotanstraße 119

80639 München-Nymphenburg

Tel: 0176-20107947

Email: anna.pallauf@gmx.de

Staatsangehörigkeit: Deutsch & Britisch

### SCHULISCHE AUSBILDUNG

1988 – 1992	Käthe-Kollwitz-Schule Gießen (Grundschule)
1992 - 08/1998	Landgraf-Ludwig-Schule Gießen (Gymnasium)
09/1998 – 12/1998	St. George's School for Girls Edinburgh, Schottland
1999 – 2001	Landgraf-Ludwig-Schule Gießen (Oberstufe)
2001	Abitur

### HOCHSCHULAUSBILDUNG

WS 2001/2002	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Regensburg
08/2003	Ärztliche Vorprüfung
WS 2003-SS 2008	Klinischer Studienabschnitt an der Universität Regensburg
SS 2008	2. Ärztliche Prüfung nach neuer AO

Praktisches Jahr:

08 - 10/2006	Prof. Dr. J. Lange, Klinik für Chirurgie, St. Gallen, Schweiz
11 - 12/2006	Prof. Dr. M. Nerlich, Abteilung für Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Regensburg



- 12/2006 - 02/2007 Prof. Dr. J. Schölmerich, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg
- 02 - 04/2007 Prof. Dr. G. Riegger, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Regensburg
- 04 - 06/2007 Prof. M. Melter, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, St. Hedwigsklinik Regensburg

#### PRAKTIKA

- 08/2004 Auslandsfamulatur in der Radiologischen Abteilung der Royal Infirmary of Aberdeen, Schottland
- 10/2007 Medical Elective in der Abteilung für Endokrinologie und Diabetes an der Royal Infirmary of Edinburgh, Schottland (Prof. Dr. Brian Frier)

#### BERUFLICHE ERFAHRUNGEN

- seit 07/2008 Assistenzärztin an der Medizinischen Poliklinik Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, Direktor Prof. Dr. M. Reincke
- seit 07/2009 Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, Direktor Prof. Dr. M. Reincke

## 12 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen und ihr Einfluss auf dendritische Zellen in Hinblick auf die Pathophysiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen“ ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, 30.12.2009

---

(Anna Pallauf)

